

Doktori (PhD) értekezés

**Fibrinolízis inhibitorok hatása az intravénás trombolízis
kimenetelére akut iszkémiás stroke-ot szenvedett
betegekben**

Székely Edina Gabriella

Témavezető: Dr. Bagoly Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalom

GYAKORI RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
A fibrinolízis	6
Az α 2-PI és főbb polimorfizmusai	8
A FXIII és főbb polimorfizmusai	11
Az iszkémiás stroke trombolitikus kezelése.....	14
CÉLKITŰZÉS.....	18
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	19
Intravénás trombolízis kezelésben részesülő akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata.....	19
Betegek bevonása	19
Etikai engedély	20
Mintagyűjtés és laboratóriumi vizsgálatok	20
FXIII aktivitás, FXIII-A ₂ B ₂ antigénszintek és főbb FXIII polimorfizmusok meghatározása	21
α 2-PI aktivitás, α 2-PI antigénszintek és az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus vizsgálata	21
Statisztikai analízis	22
EREDMÉNYEK	24
Intravénás trombolízissel kezelt akut iszkémiás stroke betegekben mért FXIII szintek ill. gyakori FXIII polimorfizmusok összefüggése a terápia kimenetelével.....	24
Vizsgálati populáció.....	24
A trombolízis hatása a FXIII szintekre	26
A felvételtkor FXIII szintek összefüggése a stroke súlyosságával és etiológiájával	26
A FXIII szintek és a trombolitikus terápia kimenetelének kapcsolata.....	27
A FXIII gyakori polimorfizmusai és a trombolitikus terápia kimenetele közötti összefüggések vizsgálata.....	33
Az α 2-PI szintek és az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus összefüggése akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek intravénás trombolízis kezelésének kimenetelével	35
Vizsgálati populáció	35
A trombolízis hatása a α 2-PI szintekre.....	37

A felvételtkori α 2-PI szintek és az akut iszkémiás stroke súlyosságának, etiológiájának kapcsolata	40
Az α 2-PI szintek és a trombolitikus terápia kimenetelének kapcsolata	42
Az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmusa és a trombolitikus terápia kimenetele közötti összefüggések vizsgálata.....	46
MEGBESZÉLÉS.....	48
Limitációk	54
ÖSSZEFOGLALÁS.....	55
SUMMARY	56
IRODALOMJEGYZÉK.....	57
TÁRGYSZAVAK.....	63
KEYWORDS	64
FÜGGELÉK.....	65
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	67

GYAKORI RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α 2-PI	α 2-plazmin inhibitor
AIS	akut iszkémiás stroke (acute ischemic stroke)
APCE	antiplazmin hasító enzim (antiplasmin cleaving enzyme)
aSICH	tünetmentes intrakraniális vérzés (asymptomatic intracranial hemorrhage)
CT	komputertomográfia (computed tomography)
FXIII	XIII-as véralvadási faktor
FXIIIa	XIII-as véralvadási faktor aktivált formája
HR	veszélyhányados (hazard ratio)
ICH	intrakraniális vérzés (intracranial hemorrhage)
IS	iszkémiás stroke
mRS	módosított Rankin skála
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
OR	esélyhányados (odds ratio)
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor-1
PAP	plazmin-antiplazmin komplex
rt-PA	rekombináns szöveti plazminogén aktivátor (recombinant tissue plasminogen activator)
SICH	tünetet képző intrakraniális vérzés (symptomatic intracranial hemorrhage)
TAFI	trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor
TOAST	Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
t-PA	szöveti típusú plazminogén aktivátor (tissue plasminogen activator)
u-PA	urokináz típusú plazminogén aktivátor (urokinase plasminogen activator)
VVT	vörösvértest

BEVEZETÉS

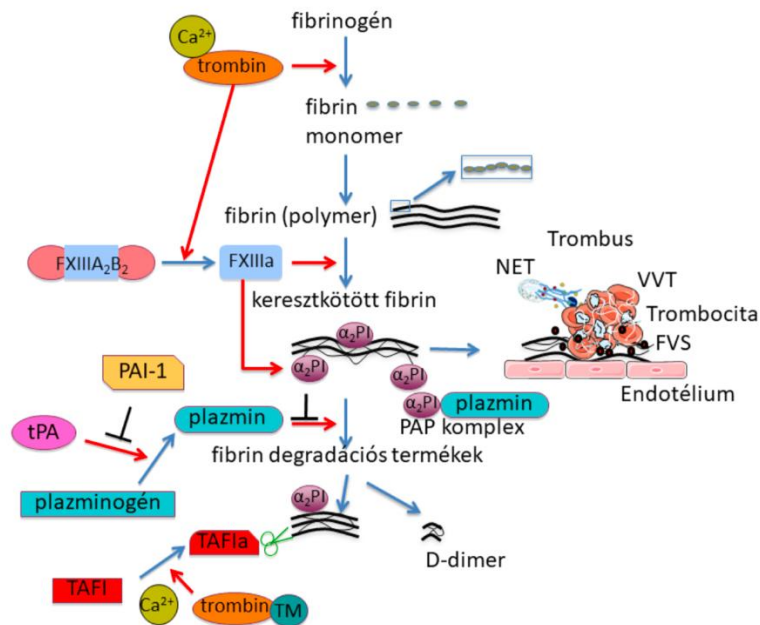
Az akut iszkémiás stroke (AIS) világszerte a vezető halálokok közé sorolható, és a felnőttkori rokkantság leggyakoribb oka (1). A trombus mesterséges lízise (trombolízise) forradalmasította az AIS kezelését és napjainkban a trombus oldására szolgáló rekombináns szöveti plazminogén aktivátor (rt-PA) kezelés a leghatékonyabb gyógyszeres terápia AIS esetén (2-4). Annak ellenére, hogy az rt-PA csak egy relatíve rövid időablakban alkalmazható, bevezetését követően azonnal egy valóban hatásos terápiás lehetőség lett egy olyan betegség esetén, ahol korábban a gyógyító eszköztár legfeljebb a rehabilitációban és a másodlagos szövődmények elkerülésében merült ki. A trombolitikus szerek közül a sztreptokinázt már az 1970-es évek óta tesztelték ugyan, de az eredmények rendszerint kiábrándítóak voltak a súlyos vérzéses szövődmények miatt (5). Az 1980-as években a neurológusok elkezdték vizsgálni az rt-PA-t, és egy úttörő tanulmányban Zivin és munkatársai ígéretes adatokat közöltek a használatáról (6). Jelenleg AIS esetén az egyetlen törzskönyvezett trombolitikus szer továbbra is az rt-PA, mely ugyan biztonságos és hatékony az esetek többségében, azonban a terápia legfőbb mellékhatása az akár végzetes kimenetelű intracerebrális vérzés, amely a betegek mintegy 3-40 %-a esetén fordul elő (7). Másfelől, az esetek többségében a terápia hatástalan, a vérrögöt nem sikerül oldani és így a klinikai javulás elmarad (2-4). Napjainkban még mindig keveset tudunk arról, hogy miért alakul ki vérzéses szövődmény egyeseknél és miért lesz hatástalan a terápia másoknál. A komplikációk előre nem megjósolhatók és kialakulásuk okait általában utólag sem lehet magyarázni. Feltételezhetjük, hogy a terápia kimenetele ill. a vérzéses szövődmények kialakulása összefüggésben lehet a lizálandó alvadék szerkezetével és a fibrinolízis ellen védelmet nyújtó fehérjék szintjével. A legfőbb fibrinolízis inhibitorok, melyek potenciális szerepe felmerül ebben a folyamatban, a véralvadás XIII-as faktora (FXIII), és az α 2-plazmin inhibitor (α 2-PI), de további fibrinolízist gátló fehérjék szerepe sem kizárható (pl. plazminogén aktivátor inhibitor-1, trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor). A téma társadalmi jelentősége és fontossága ellenére ez a kutatási terület erősen alulreprezentált. Mindezt bizonyítja egy nemrégiben publikált szisztematikus összefoglaló közlemény, melyben több, mint 6000 közlemény elemzése során csak négy olyat találtak, ahol a szerzők legalább 100 AIS beteg bevonásával vizsgálták a hemosztázis egyes elemeit trombolízis előtt vett vérmintákból (8). A fibrinolízis regulátorok trombolízisben betöltött szerepének jobb megismerése fontos lehet a jövőben az AIS betegek hatékonyabb kezelésének céljából: egyrészt az ismeretek irányt szabhatnak az új típusú gyógyszeres kezelések kifejlesztéséhez, másfelől olyan tényezőkre is

fény derülhet, melyek kapcsán lehetőség nyílt az olyan betegek identifikálására még a terápia adása előtt, akikben nagy eséllyel alakulhat ki vérzéses szövődmény. Napjainkban a nagyérelzáródások során alkalmazható mechanikus trombektómia ill. kombinálása rt-PA kezeléssel új távlatokat nyitott, de továbbra is csak specializált centrumokban, kevés beteg számára elérhető (9, 10). Annak ismerete, hogy milyen hemosztázis tényezők befolyásolják a trombolízis kimenetelét, hosszú távon hozzájárulhat a diagnosztikai eszköztárunk bővüléséhez, segítve a klinikai döntéshozatalt, a biztonságosabb és hatékonyabb terápiás gyakorlat érdekében.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A fibrinolízis

A fibrin - mint a véralvadási kaszkád elsődleges terméke és a fibrinolízis végső szubsztrátja - központi szerepet tölt be a hemosztázis folyamatában. A fibrin képződését a trombin katalizálja, azáltal, hogy kiasítja a fibrinopeptideket a fibrinogénből. A szolubilis fibrin polimerizáció révén oldhatatlanná válik, és szerkezetét az aktivált XIII-as faktor (FXIIIa) keresztkötések révén stabilizálja. A keresztkötött fibrinalvadék lokalizált, megfelelő időben történő lebontásáért a fibrinolitikus rendszer felelős, melynek központi proteáza a plazmin. A fibrinolízis hatékonyságát *in vivo* nagymértékben befolyásolják a fibrinalvadék szerkezetét meghatározó biokémiai tényezők, a véralvadékban lévő sejtes elemek, és az általános biokémiai környezet. A fibrinolitikus rendszer szabályozása, akár csak az alvadási kaszkádé, kofaktorok, receptorok és inhibitorok finoman összehangolt rendszere révén valósul meg (1. ábra) (11).



1. ábra. A fibrinolízis egyszerűsített folyamatábrája.

FVS: fehérvérsejt, FXIIIa: aktivált XIII-as faktor, FXIIIa₂B₂: XIII-as faktor komplex (tetramer) formája, NET: neutrofil extracelluláris csapda, PAP komplex: plazmin- antiplazmin komplex, t-PA: szöveti típusú plazminogén aktivátor, TAFI: trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor, TAFIa: aktivált TAFI, TM: trombomodulin, PAI-1: plazminogén aktivátor inhibitor-1, α_2 -PI: α_2 -plazmin inhibitor, VVT: vörösvértest. Forrás: a szerző ábrája

A fibrinolízis központi enzime a szerin proteázok csoportjába tartozó plazmin. A plazmin inaktív zimogén formája, a plazminogén túlnyomórészt a májban szintetizálódik és ~150 µg/ml koncentrációban kering a plazmában (12). A plazminogén szerkezetileg egy N-terminális Pan-apple doménből (PAP), 5 kringle (perec) doménből és egy szerin proteáz doménből áll. A kringle domének C-terminális lizin-reziduumok megkötésére alkalmas motívumot tartalmaznak. Ezek a lizin-kötő domének közvetítik a fehérje specifikus kölcsönhatásait a fibrinnel, sejtfelszíni receptorokkal és más fehérjékkel, inhibitorokkal (13). A PAP domén vagy aktivációs peptid fontos szerepet játszik a plazmin aktivitásának és aktivációjának szabályozásában, jelenlétében a plazminogén zárt konformációban található. A nyitott konformáció a domén plazmin által történő hasításával, vagy lizinnek/lizin-analógoknak a lizin-kötő doménekhez való kötődésével stabilizálható (14). A plazminogén aktivációját fiziológias körülmények között plazminogén aktivátorok katalizálják. Az aktiváció során a plazminogén C-terminális régiójában az 560-561 pozícióban lévő Arg-Val peptidkötés hasításával a katalitikus triád hozzáférhetővé válik a szerin proteáz doménben (15).

A két fiziológias plazminogén aktivátor a szerin proteázok csoportjába tartozó urokináz típusú plazminogén aktivátor (u-PA) és a szöveti típusú plazminogén aktivátor (t-PA). A t-PA-t elsősorban az endotélsejtek szintetizálják és szekretálják, míg az u-PA-t monociták, makrofágok, renális epithel sejtek és egyes daganatsejtek termelik. A specifikus inhibitorok magas koncentrációi miatt mindkét aktivátor rendkívül rövid felezési idővel rendelkezik a keringésben, féléletidejük mindössze 4-8 perc (11).

A t-PA fibrin hiányában gyenge affinitással kötődik a plazminogénhez. A plazminogén lizin-kötő doménje és a fibrinogén C-terminálisán található lizinek közötti interakció több százszorosára növeli a plazminogén aktiváció hatékonyságát. A képződő plazmin által vezérelt fibrin degradáció újabb C-terminális lizin maradékokat eredményez, ezáltal még több kötőhelyet biztosít a plazminogénnek és a t-PA-nak, pozitív visszacsatolási mechanizmust hozva létre. A t-PA révén kialakuló plazminogén aktiváció leginkább az érpályán belüli fibrin degradációt segíti: megakadályozza az intravaszkuláris fibrin szükségtelen felhalmozódását és lehetővé teszi a már kialakult alvadékok eltávolítását. A t-PA-val ellentétben az u-PA nem rendelkezik fibrin kötőhellyel. Specifikus sejtfelszíni u-PA receptorokhoz kötődve elsősorban a sejtfelszínhez kötött plazminogént aktiválja. A sejtfelszínen aktivált plazmin fontos szerepet játszik az extracelluláris mátrix lebontásában és egyes növekedési faktorok aktiválásában, így az u-PA fiziológias körülmények között az intravaszkuláris fibrin lebontásban nem vesz részt (16-18).

A fibrinolitikus rendszer proteázainak működése számos endogén inhibitor által biztosított szigorú szabályozás alatt áll. A plazminogén aktivátorokat és magát a plazmint a keringésben mindig túlsúlyban lévő szerin proteáz inhibitorok, másnéven szerpinek semlegesítik (19). A plazminogén aktivátorok legfőbb fiziológiai inhibitora a t-PA-t és u-PA-t egyaránt hatékonyan gátló plazminogén aktivátor inhibitor-1 (PAI-1) (20). A PAI-1 egy 45 kDa nagyságú egyláncú glikoprotein, mely a fibrinolitikus rendszer kulcsfontosságú regulátora. Számos szövet- és sejttípusban termelődik, többek között a májban, lépben, endotélsejtekben, simaizom sejtekben, makrofágokban illetve adipocitákban (21). A keringő vérlemezkék is folyamatosan szintetizálják a PAI-1-et, így a trombocita aktiváció során felszabadulva akár tízszeresére emelkedhet a PAI-1 lokális koncentrációja, mérsékelve a fibrinolízist a véralvadás kezdetén (22). A PAI-1 termelődését és szekrécióját számos genetikai faktor és különböző állapotok, pl. inzulin rezisztencia, elhízás, plazma lipidek szintje, valamint a cirkadián ritmus is befolyásolja. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy több gyulladásos citokin, egyes növekedési faktorok, hormonok, a glükóz és endotoxinok is stimulálják a PAI-1 expresszióját (23-25). Az elsőként placentából kinyert PAI-2 gyengébb inhibitor tulajdonságokkal rendelkezik, elsősorban az u-PA gátlásában vesz részt hatékonyan. A PAI-2 egészséges egyéneknél lényegében nem mutatható ki, de a terhesség alatt plazmakoncentrációja drasztikusan megemelkedik (26).

Az aktivált plazmin legfőbb természetes inhibitora az α 2-PI. Az α 2-PI gyorsan és irreverzibilisen kötődik a szabad plazminhoz 1:1 arányú stabil, inaktív plazmin-antiplazmin komplexet képezve. A fibrinhez kötött plazmin védett az α 2-PI gátló hatásával szemben, biztosítva a fibrin proteolitikus lebontását (27).

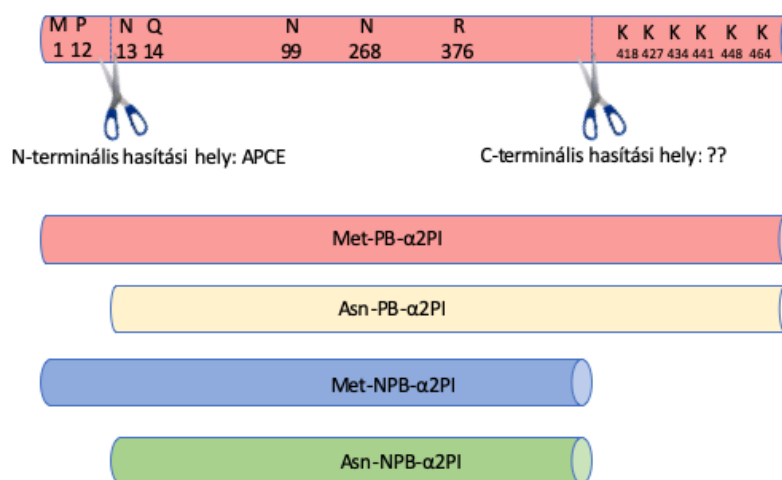
A fibrinolízis nem szerpín-függő szabályozása többek között a trombin aktiválta fibrinolízis inhibitor (TAFI) révén valósul meg. A TAFI-t a máj és a megakariociták inaktív zimogénként szintetizálják. A proenzimet a trombin, a trombin-trombomodulin komplex vagy a plazmin alakítja át funkcionálisan aktív formává. A TAFI 4-15 μ g/mL koncentrációban van jelen a keringésben. Aktív formája egy karboxipeptidáz, amely eltávolítja a fibrin C-terminális lizin- és arginin-oldalláncait, ezáltal csökkenti a rendelkezésre álló plazminogén kötőhelyek számát, lelassítva a plazmin képződését és ezáltal stabilizálva az alvadékot (28, 29).

Az α 2-PI és főbb polimorfizmusai

Az α 2-PI-t először 1976-ban írta le három különböző kutatócsoport (Mullertz, Moroi és Collen és munkatársai) a plazmin gyorsan ható inhibitoraként. Ennek köszönhetően a szakirodalomban

három eltérő elnevezés is használatos: α 2-plazmin inhibitor, antiplazmin és elsődleges plazmin inhibitor (30-32). Az emberben az α 2-PI szintézisének elsődleges helye a máj, de kisebb mértékben a vesében, a vérlemezkékben, a gyomor-bél traktusban, az izmokban, a tüdőben, a méhlepényben és az agyban (agykéreg, hippocampus és kisagy) is termelődik. Alzheimer-kórban szenvedő betegekben megnövekedett expressziója az amiloid β plakkokhoz köthető (33, 34). Az α 2-PI körülbelül 70 kDa méretű, 464 aminosavból álló egyláncú polipeptidként szekretálódik a plazmába. Az α 2-PI egyedi szerkezeti elemeket mutató szerpin, mely egy 12 aminosavból álló N-terminálissal, központi szerpin doménnel és egy ~55 aminosav hosszúságú C-terminális farokkal rendelkezik (35, 36).

A keringésbe kerülve mind az amino-terminális, mind pedig a karboxi-terminális rész proteolitikus módosításokon esik át (2. ábra). Ennek következtében négy heterogén, eltérő aktivitású α 2-PI izoforma jön létre (37). A szekretálódó fehérje N-terminálisán metionint hordoz (Met- α 2-PI). A keringésbe kerülve azonban az α 2-PI körülbelül 70%-a egy olyan proteolitikus hasításon megy keresztül, amely során az antiplazmin hasító enzim (APCE) az amino-terminális vég felől eltávolít egy 12 aminosavból álló oligopeptidet (35, 38). Lee és munkatársai kimutatták, hogy a hasított (Asn- α 2-PI) izoforma 13-szor gyorsabban inkorporálódik a fibrinszálak közé, mint a teljes hosszúságú Met- α 2-PI fehérje (38). Az α 2-PI fibrinhez történő keresztkötését az FXIIIa katalizálja, a keresztkötött inhibitor ellenállóbbá teszi a fibrint a plazmin révén létrejött degradációval szemben. Mivel a Met- α 2-PI keresztkötése lassabban megy végbe, ezért ezen izoforma emelkedett szintje fokozott mértékű fibrinolízissel társul (38).



2. ábra. Az α 2-PI természetes heterogenitása. Abdul et al (37) alapján módosítva.

A keringésben az α 2-PI N-terminális és C-terminális hasításon megy keresztül, melynek következtében az α 2-PI 4 különböző izoformában fordul elő (Met-PB- α 2-PI, Asn-PB- α 2-PI, Met-NPB- α 2-PI, Asn-NPB- α 2-PI). APCE: antiplazmin hasító enzim

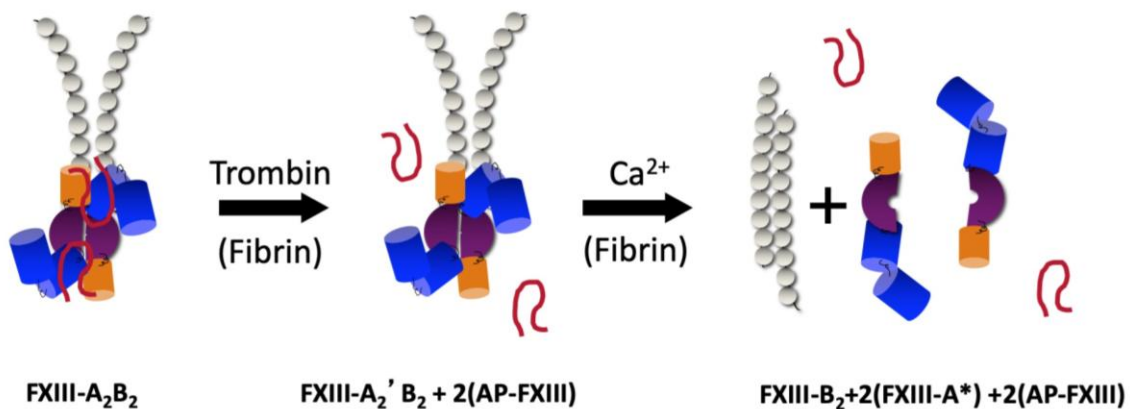
Az α 2-PI C-terminális része is átesik poszttranszlációs módosításokon, de a hasításért felelős enzimet még nem azonosították. Az itt található lizin oldalláncok kulcsfontosságú szerepet töltenek be a plazminogén lizin-kötő helyeivel való kölcsönhatásban (39). E kölcsönhatás alapján két izoformát különböztetünk meg. A nem hasított, hosszabb, plazminogén kötésre képes forma (PB- α 2-PI) a keringésben lévő α 2-PI hozzávetőleg 65%-át teszi ki és plazmin-antiplazmin komplexek kialakulása révén hatékonyan gátolja a plazmint. Ezzel szemben a rövidebb, hasított izoforma nem képes kötődni a plazminogénhez (NPB- α 2-PI) (40). Az α 2-PI C-terminális hasítása jelentős klinikai következményekkel járhat, mivel az aktivált FXIII által mediált α 2-PI-fibrin keresztkötés létrejöttéhez elsősorban a PB- α 2-PI formára van szükség. Ebből következik, hogy a C-terminális hasítás szabályozza az α 2-PI aktivitását is (37, 41).

Az α 2-PI heterogenitását a felsorolt módosításokon kívül az azt kódoló SERPINF2 gén genetikai variációi is befolyásolják. Egy vérzésre hajlamos család vizsgálata során Lind és munkatársai az α 2-PI gén 3 polimorfizmusát azonosították. Ezek egyike a Met- α 2-PI gén 6. aminosavát kódoló nukleotidokat érintő C/T egyponos nukleotid polimorfizmus (SNP) volt, ami arginint vagy triptofánt eredményezhet a hatos pozícióban. A tanulmány továbbá igazolta, hogy mindkét forma előfordul egészséges humán plazmában (42). Christiansen és munkatársainak sikerült bizonyítani, hogy a p.Arg6Trp egy funkcionális polimorfizmus, ami befolyásolja a Met- α 2-PI átalakulását az Asn- α 2-PI formává, ezáltal befolyásolja az α 2-PI fibrinbe való beépülésének sebességét. Kimutatták, hogy az N-terminális hasítást végző APCE körülbelül nyolcszor gyorsabban hasítja a Met- α 2-PI (Arg6) formát, mint a triptofánt hordozó Met- α 2-PI-t, és az argininra nézve homozigóta egyénekben a legnagyobb az N-terminális proteolízis mértéke (43). A p.Arg6Trp polimorfizmus patofiziológiai ill. klinikai jelentősége jelenleg még kutatások tárgyát képezi. Intézetünk egyik munkacsoportja korábban úgy találta, hogy a Trp allél jelenléte nem befolyásolta a vénás trombózisok kialakulásának kockázatát (44). Bridge és munkatársai a p.Arg6Trp polimorfizmus és a hasi aorta aneurizma kialakulása közötti összefüggéseket vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy Trp allél hordozása kismértékben, de nem szignifikánsan csökkenti az aneurizma kialakulásának kockázatát. Eredményeik azt mutatták, hogy az α 2-PI egy másik polimorfizmusa (p.Arg407Lys) azonban szignifikánsan összefügg az hasi aorta aneurizma kialakulásával, a Lys407-t hordozókban 23%-kal csökkentve annak kockázatát (45).

A FXIII és főbb polimorfizmusai

A FXIII, más néven fibrin stabilizáló faktor, a koagulációs kaszkád utolsó alvadási faktora, egyben a fibrinolízis egyik legfőbb inhibitora. Fiziológias funkciója a fibrin keresztkötésekkel történő stabilizálása és ellenállóvá tétele a fibrinolízis gyors hatásával szemben. A plazmában található FXIII heterotetramer szerkezetű (FXIII-A₂B₂), 325 kDa molekula tömegű fehérje. A tetramert két potenciálisan katalitikus A alegység (FXIII-A) és két hordozó/gátló B alegység (FXIII-B) alkotja. Fiziológias körülmények között a plazmában mért koncentrációja 14-28 mg/L, ahol az inaktív fehérje fibrinogénhez kötött formában kering (46, 47). A FXIII-A csontvelői eredetű sejtekben, míg a FXIII-B hepatocitákban termelődik, az alegységekből a plazmában alakul ki a tetramer szerkezet. A feleslegben rendelkezésre álló B alegység körülbelül 50%-a szabad, nem komplex formában fordul elő a plazmában. A FXIII celluláris formája csupán a két potenciálisan katalitikus alegységből (FXIII-A₂) áll, mely számos sejttípus citoplazmájában megtalálható (pl. monocitákban/makrofágokban, vérlemezkékben, oszteoblasztokban). A vérlemezkékben a FXIII-A₂ mennyisége 46-82 fg/trombocita, ami az összes vérlemezke-fehérje 3%-ának felel meg (48, 49). A FXIII a transzglutaminázok családjába tartozó zimogén (protranszglutamináz). A katalitikus A alegységet 5 domén építi fel: a 37 aminosav hosszúságú N-terminális aktivációs peptid domén, egy β-szendvics, egy katalitikus központi domén, és két β-hordó domén. A katalitikus domén hordozza az enzimreakcióért felelős katalitikus triádot, ami az inaktív enzimben a szubsztrát számára hozzáférhetetlen. A B alegység egy kb. 8,5% szénhidrátot tartalmazó glikoprotein, mely összesen tíz, egyenként két diszulfid-híddal stabilizált, ún. sushi doménből áll. A B alegység protektív szerepet tölt be, gátolja a katalitikus alegység degradációját, ezáltal annak élettartamát 3 nappól 11 napra növeli. Korábbi kutatási eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a fibrinogén és az FXIII-A₂B₂ zimogén közötti kölcsönhatást a FXIII-B alegységek közvetítik (50, 51). A plazmában található FXIII protranszglutamináz aktivációja a véralvadási kaszkád utolsó lépésében történik, a trombin és a Ca²⁺ összehangolt hatása révén alakul át a fehérje aktív transzglutaminázzá (3. ábra). Első lépésként az FXIII-A alegységek N-terminálisáról a trombin lehasítja az aktivációs peptidet (52). Ezt követően Ca²⁺ hatására a B alegységek disszociálnak, majd a hasított katalitikus alegység konformációváltáson megy keresztül. Ennek hatására az aktív hely hozzáférhetővé válik, kialakul az aktív forma (FXIIIa) (53). A fibrin jelenléte 80-100-szorosra gyorsítja az aktivációs folyamatot, a plazmában pedig az újonnan képződött fibrin

felületén aktiválódik a FXIII (54). FXIII-B hiányában a FXIII celluláris formája nem igényel proteolitikus hasítást, az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció emelkedése elegendő az aktív konfiguráció létrejöttéhez (55). A FXIIIa egy acil-transzfer reakciót katalizál, amelyben az acil donor egy peptidláncban található glutamin γ -karboxamid-csoportja, az acil akceptor egy primer amin. A folyamatban a primer amin izopeptid kötéssel kovalensen kapcsolódik a γ -glutamil oldallánchoz. Ha a primer amin egy peptidben/fehérjében lévő lizin ϵ -amino csoportja, az FXIIIa intermolekuláris ϵ -N-(γ -glutamil)-lizil keresztkötés révén kovalensen keresztköti a két polipeptid láncot (56).



3. ábra. A XIII-as faktor (FXIII) proteolitikus aktivációjának sematikus ábrázolása. Bagoly et al (57) alapján módosítva.

Az ábrán az FXIII-A₂B₂ tetrameren belül a két FXIII-A alegység egyes doménjeit különböző színek mutatják: N-terminális aktivációs peptid (piros vonal), β -szendvics domén (narancssárga henger), katalitikus központi domén (sötétlila félkör), β -hordó domének (sötétkék hengerek). A FXIII-B alegységeket 10 tagból álló szürke gyöngysorok reprezentálják. FXIII-A₂B₂: tetramer pro-transzglutamináz, FXIII-A₂'B₂: trombin által hasított tetramer, FXIII-A*: aktív transzglutamináz (nyitott konformációjú aktív centrum: lyukas sötétlila félkör), AP-FXIII: aktivációs peptid

A FXIIIa meghatározó szerepet tölt be fibrinolízis szabályozásában. Antifibrinolitikus hatása 3 fő mechanizmus révén valósul meg. Egyrészt a FXIIIa kovalens keresztkötések révén beépíti az α 2-PI-t és más plazmakomponenseket a képződő fibrin alvadékba, ezáltal hatékony védelmet nyújt az idő előtti plazmin közvetített proteolitikus fibrinbontással szemben (58). Másrészt katalizálja fibrin α - és γ -láncainak keresztkötését. A keresztkötés mechanikusan stabilizálja a fibrin alvadékot a véráramlás okozta nyírófeszültséggel szemben és közvetlenül befolyásolja a fibrin alvadék fibrinolízissel szembeni érzékenységét. Harmadrészt, a fibrin α -láncok C-terminális lizinjeinek keresztkötése következtében csökken a plazminogén és t-PA számára

elérhető kötőhelyek száma a fibrinen, tehát csökken a plazminogén aktiváció mértéke. A FXIII hiány következtében vérzékenység alakul ki, mely a deficiencia mértékétől függően súlyos, akár életveszélyes is lehet. Veleszületett forma esetén jellegzetes a köldökcsont elhúzó vérzése, lassú sebgyógyulás, de jellemző a bőr-, izom-bevérzések, nyálkahártyavérzések kialakulása, továbbá rettegett következményként igen súlyos, akár végzetes intrakraniális vérzés is kialakulhat (56, 58, 59).

A humán FXIII-A-t kódoló gén (F13A1) több mint 160 kb méretű, és a 6p24–25 kromoszómán lokalizálódik. A FXIII-B-t (F13B) kódoló gén 28 kb hosszú; az 1q31-32.1 kromoszómán található, és 12 exonból és 11 intronból áll (60, 61). Öt gyakori kódoló polimorfizmust azonosítottak az A-alegységben (p.Val34Leu, p.Tyr204Phe, p.Pro564Leu, p.Val650Ile, p.Glu651Gln) és kettőt a B-alegységben (p.His95Arg és c. 1952 + 144 C > G a K intronban) (48, 56).

Az FXIII leginkább tanulmányozott polimorfizmusa a p.Val34Leu. Ez az SNP az A alegységet kódoló gén 103-as kodonját érintő G>T csere, melynek következménye a 34-es pozícióban található valin leucinra történő cseréje (62). A p.Val34Leu polimorfizmus az aktivációs doménen belül található trombin hasítási hely közelében helyezkedik el, ezáltal befolyásolja FXIII aktiváció sebességét. A Leu34 variáns esetében a trombin hasítás 2,5-szer gyorsabban megy végbe, így a Leu34 allél jelenléte fokozott FXIII aktivációval jár együtt. Ennek megfelelően a növekvő alvadékban gyorsabban megy végbe a fibrin keresztkötése (63, 64). A polimorfizmus hatással van a keresztkötött fibrinháló szerkezetére is, melyet a fibrinogén koncentrációja is befolyásol. Magas fibrinogén koncentráció mellett a Leu34 allélre homozigóta egyénekben vastagabb fibrinrostokkal, lazább szerkezettel és fokozott permeabilitással jellemezhető alvadék alakul ki, mely a fibrinolízissel szemben kevésbé ellenálló (64). A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus és a vénás ill. artériás trombózisok kialakulásának rizikójával az elmúlt két évtizedben számos tanulmány foglalkozott, melyek eredményei gyakran voltak ellentmondásosak. E vizsgálatok metaanalízise arra utal, hogy a 34Leu allél jelenléte kismértékű, de szignifikáns védelmet nyújt a koszorúér-betegség és a vénás tromboembóliák kialakulásával szemben, ugyanakkor nem tűnik jelentős védő- vagy kockázati tényezőnek iszkémiás stroke kialakulására nézve (65-67).

A FXIII-A alegység további gyakori polimorfizmusainak patofiziológiás szerepével kapcsolatban lényegesen kevesebb irodalmi adat áll rendelkezésre (68, 69). Pruissen és mtsai. szoros összefüggést találtak a p.Tyr204Phe variáns és a fiatal nők iszkémiás stroke kockázata között. Az általuk vizsgált kohorszban a Phe204 allél hordozása által jelentett kockázatot tovább növelte az orális fogamzásgátlók használata. Adataik alapján a FXIII-A p.Pro564Leu

polimorfizmus viszont nem befolyásolta az iszkémiás stroke kialakulásának kockázatát az általuk vizsgált populációban (70). Ugyanakkor Reiner és mtsai. azt találták, hogy a 45 év alatti nők esetében a FXIII Phe204 és Leu564 variánsai a hemorrhagiás stroke-ra való genetikai hajlam markereiként szolgálhatnak (69).

Molekuláris genetikai és biokémiai technikák két fő polimorfizmust tártak fel az F13B génben. A 3. exonon belüli A>G csere His-Arg aminosavcseréhez vezet az érett fehérje 95. pozíciójában. Az Arg95 viszonylag ritka (7,5%) a kaukázusi populációban. A p.His95Arg polimorfizmust a vénás tromboembólia kockázati tényezőjeként azonosították, továbbá kimutatták, hogy 1,7-szeresére növelte az iszkémiás stroke kockázatát a fiatal nőknél (70, 71). Az FXIII-B génben leírt másik polimorfizmus az intron K 29756. nukleotid pozíciójában található C>G csere, ami egy új splice akceptor helyhez vezet. A polimorfizmus egy allélspecifikus splicing terméket eredményez, amelyben az utolsó 10 aminosav egy 25 aminosavból álló alternatív szekvenciával cserélődik ki. A variáns szekvencia két további lizint és egy glutaminsavat tartalmaz. Ezek a töltött aminosavak megváltoztatják a fehérje izoelektromos pontját. A polimorfizmus jellemzően az ázsiaiakban fordul elő, a kaukázusi populációban az allélgyakoriság 14,2% (72).

Az iszkémiás stroke trombolitikus kezelése

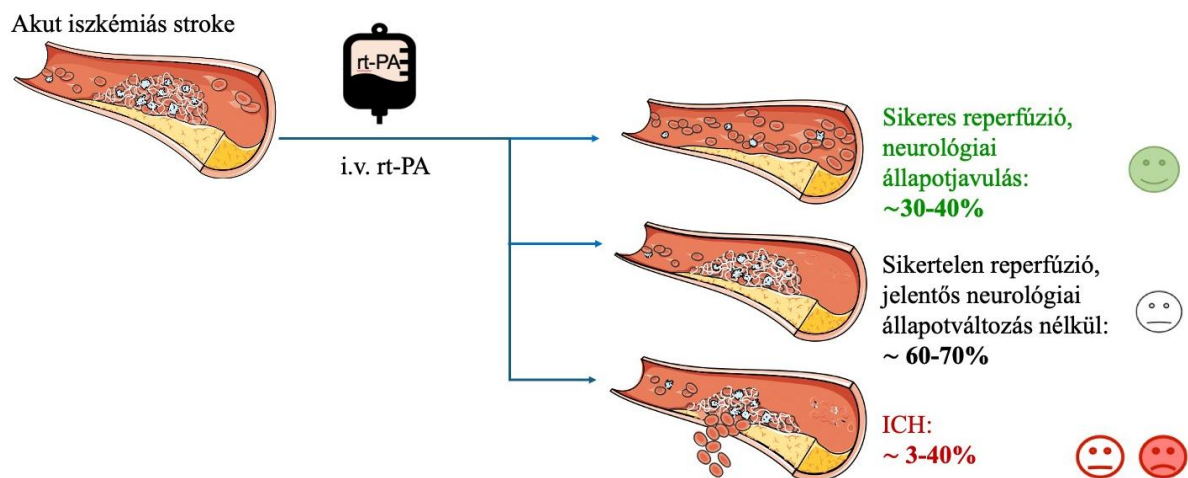
A stroke definíció szerint az agyműködés vérellátási zavara által okozott, fokális (vagy globális) zavarral jellemezhető, gyorsan kialakuló klinikai tünetegyüttes, amely több mint 24 órán keresztül áll fenn vagy halált okoz, és amelynek bizonyíthatóan nincs más oka, mint az agyi érrendszerben kialakult elváltozás (73). A stroke az egyik legfontosabb és legsúlyosabb érrendszeri betegség, mely a mortalitási statisztikák élén áll világszerte. Mivel a stroke a felnőttkori rokkantság vezető oka, társadalmi-gazdasági terhe az összes vaszkuláris betegség között a legnagyobb. Ezért rendkívül fontos a stroke korai felismerése és gyors kezelése a morbiditás és mortalitás megelőzése vagy minimalizálása érdekében (74). A patomechanizmus alapján leggyakrabban előforduló heveny agyi érkatasztrófák iszkémiás eredetűek, melyek az összes akut stroke 80%-át teszik ki. A fennmaradó mintegy 20%-ban vérzéses kóreredit áll a tünetek hátterében. A vérzéses stroke-on belül két fő altípust különböztethetünk meg: intracerebrális vérzés (ICH) (15%) és subarachnoideális vérzés, mely utóbbi az összes stroke esetek körülbelül 5%-át teszi ki (75).

Az iszkémiás stroke az agy körülírt területeinek hirtelen kialakuló funkcionális károsodása, amely úgy jön létre, hogy a kérdéses agyi régió vérellátását biztosító erekben akadály keletkezik. Az AIS esetek kb. 45%-a lokális ateroszklerózis talaján alakul ki, trombotikus eredetű. Az esetek jelentős részében az intrakraniális nagyerek érintettsége figyelhető meg, ahol a ruptúrált ateroszklerotikus plakkok felszínén alakul ki a trombus. A trombotikus stroke másik típusa a kis agyi erek elzáródásával jár. Ezek az ún. lakunáris stroke-ok általában hipertóniás előzmény talaján alakulnak ki. Amennyiben az artéria elzáródását pitvarfibrilláció során keletkező trombus, a carotis nyaki szakaszából, esetleg a felszálló aortából származó trombus embolizációja okozza, kardioembóliás stroke-ról beszélünk, mely az összes iszkémiás stroke kb. 20%-t adja. Az iszkémiás stroke-ok 20-30%-a kriptogén, azaz az infarktus nem köthető definitív embóliaforráshoz, nagyér-ateroszklerózishoz vagy kisérbetegséghez (75, 76). A fentiek alapján az iszkémiás stroke etiológiai altípusai a klasszikus TOAST (Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment) kritérium rendszer szerint az alábbi etiológiai csoportba sorolhatóak: nagyartériás ateroszklerózis, kardioembólia, kisérelzáródás (lakunáris stroke), egyéb meghatározott patogenezisű, illetve kriptogén stroke (76).

Az iszkémiás stroke esetek súlyosságának objektív felmérésére a National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) skálarendszert alkalmazzák. A NIHSS pontszámok növekedése jelzi a neurológiai deficit mértékét, korrelál a stroke súlyosságával és tükrözi a klinikai státuszt (77). Az NIHSS pontszám előrejelzi a klinikai kimenetelt és a magas pontszám felhívja a figyelmet a jövőben kialakuló szövődmények fokozott kockázatára. A stroke súlyosságának radiológiai felmérésére többféle pontrendszert alkalmaznak. Az Alberta Stroke Program Early CT Score (ASPECTS) az arteria cerebri media területi iszkémiás stroke kiterjedésének meghatározására használatos, 10 pontos kvantitatív rendszer (78). A rendszer az arteria cerebri media ellátási területét 10 szegmentumra osztja fel: 1 pont kerül levonásra, ha egy adott szegmentumban megfigyelhető iszkémiás lézió. A felvételi CT vizsgálat során a ≤ 7 pont a kedvezőtlen funkcionális kimenetel prediktora intravénás trombolízis esetén (78).

AIS-t elszenvedők gyógyulási esélye az elzáródott ér viszonylag rövid időn belül történő sikeres megnyitásától múlik. A rekanalizáció történhet a trombus gyors gyógyszeres feloldásával (trombolízis) és/vagy műtéti eltávolításával (mechanikus trombektómia). Magyarországon jelenleg az egyetlen trombolízisként alkalmazható törzskönyvezett készítmény AIS esetén az rt-PA (Alteplase, Actilyse; Boehringer Ingelheim). Az intravénás rt-PA-val történő trombolízis alkalmazására leginkább a tünetek megjelenését követő 4,5 órán belül van lehetőség a beválasztási és kizárási kritériumok alapján alkalmas lízis-jelölt stroke betegek számára, speciális képzett vizsgálatok esetén 9 órára kitolható az időablak

(2-4). Annak ellenére, hogy manapság ez egy rutinszerűen alkalmazott terápia, a szűk időintervallum miatt az AIS-ban szenvedő betegek többsége nem részesül ilyen kezelésben (2, 79, 80). Az irányelvek szerint a készítmény alkalmazása 0,9 mg/ttkg dózisban történik, maximálisan adható mennyisége 90 mg. Az AIS betegek a dózis első 10%-át bólusban, a fennmaradó 90%-ot pedig 60 perc alatt perfúzorban kapják (80, 81). Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy az időablakon belül elvégzett intravénás trombolízis szignifikáns neurológiai javulást eredményezett, azonban hatékonysága annál nagyobb, minél rövidebb a tünetek megjelenése és az rt-PA kezelés között eltelt idő (80, 82). Annak ellenére, hogy az rt-PA kétségtelen előnyökkel jár az AIS kezelésében, a kedvező terápiás kimenetel a betegek mindössze ~30-40%-ánál figyelhető meg (4. ábra), nagyér okklúzió esetén pedig nagymértékben csökken a hatékonysága. A trombolízis terápia szövődmenyeként a vérzési kockázat minimalizálása ellenére is a betegek körülbelül 3-40%-ban kialakul az iszkémiás stroke vérzéses transzformációja (vizsgálatról ill. definíciótól függően), mely az esetek felében tünetekkel jár és rontja a betegség kimenetelét, akár halálos szövődmenyt is okozhat (7, 83).



3. ábra. Az akut iszkémiás stroke trombolitikus terápiájának kimenetele.

A klinikai javulással kísért sikeres reperfúzió csak az esetek mintegy 30-40%-ban következik be, míg az esetek jelentős részében potenciálisan végzetes vérzéses transzformáció alakul ki. ICH: intrakraniális hematóma, rt-PA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor

Napjainkban a mechanikus trombektómia néven ismert endovaszkuláris terápia a standard ellátás nagyérelzáródások esetén. A mechanikus rekanalizáció során az eret elzáró trombuszt katéteres úton távolítják el. A beavatkozás 6 órás időablakkal hatékonyan alkalmazható, de válogatott betegcsoportnál az időablak 24 órára bővíthető. A kezelés gyakorlati korlátja, hogy a stroke-betegeknek csupán csak ~20%-a szenved nagyérelzáródásban, és az ilyen betegek

időablakon belüli ellátása kihívást jelent, mivel az eljárást csak magasan specializált centrumokban lehet elvégezni (9, 10).

CÉLKITŰZÉS

Munkánk során célunk volt megvizsgálni, hogy a fibrinolízis legfontosabb inhibitorai közül a FXIII ill. az α 2-PI szintje és gyakori polimorfizmusai mutatnak-e összefüggést az intravénás trombolízis kimenetelével AIS betegeknél.

Részleteiben, prospektív obszervációs tanulmányok révén célul tűztük ki megvizsgálni, hogy:

1. Intravénás trombolízis kezelésben részesülő AIS-t elszenvedett betegek trombolízis előtti ill. trombolízis utáni plazmamintáiban hogyan változik a FXIII ill. az α 2-PI aktivitás és antigénszintje, és mutatnak-e összefüggést az eredmények a betegek kimenetelével és a vérzéses szövődmények kialakulásával.
2. A FXIII-A és FXIII-B alegységek gyakori polimorfizmusai (FXIII-A p.Val34Leu, p.Tyr204Phe és FXIII-B p.His95Arg, intron K c. 1952 + 144 C > G) ill. az α 2-PI p. Arg6Trp polimorfizmusok befolyásolják-e a trombolízis kimenetelét és a vérzéses szövődmények kialakulását.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Intravénás trombolízis kezelésben részesülő akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek vizsgálata

Betegek bevonása

Két prospektív obszervációs tanulmányt végeztünk. Mindkét tanulmány esetén a stroke kezdetétől számított legfeljebb 4,5 órán belül intravénás trombolízis kezelésben részesült AIS betegek kerültek beválogatásra a Debreceni Egyetem Neurológiai Klinikájával kollaborálva. Az első tanulmányba a betegek beválogatása 2011 márciusában kezdődött, és 2013 januárban ért véget, a második tanulmány esetén a betegek beválogatása folytatódott és 2016 szeptember-2019 április között további betegek kerültek be a vizsgálatba. A betegek kezelése a vizsgálat teljes időtartama alatt egységes volt. Az intravénás trombolízist az Európai Stroke Organisation (ESO) 2008. évi rt-PA (Alteplase, Boehringer Ingelheim, Ingelheim an Rhein, Németország) kezelésre vonatkozó irányelvei szerint alkalmazták (84). A betegek beválogatási és kizárási kritériumai megegyeztek a trombolitikus terápia beválogatási és kizárási kritériumaival. A bevont betegek közül senki sem részesült mechanikus trombektómiában, a beavatkozás vagy nem volt elérhető a vizsgálati időszakban, vagy a beteg nem volt alkalmas a beavatkozásra. Az AIS jelenlétét a klinikai tünetek jelenléte és a képalkotó eljárások eredményei alapján diagnosztizálták nem kontrasztos számítógépes tomográfia (CT) és CT angiográfia (CTA) segítségével. A felvételtkor és a lízis után 24 órával készített CT-felvételeket három független radiológus egyidejűleg elemezte, és meghatározták az ASPECTS értéket (78). Minden betegnél regisztrálták a tünetek jelentkezésének időpontját, az alapvető demográfiai és klinikai jellemzőket (életkor, nem, BMI, korábbi gyógyszerek, cerebro- és kardiovaszkuláris rizikófaktorok jelenléte, pl. dohányzás). A stroke súlyosságát a National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) segítségével határozták meg a felvételtkor és a terápia utáni 7. napon (77). A stroke etiológiáját a TOAST kritériumrendszer alapján osztályozták (76). A betegek hosszú távú funkcionális kimenetelét 3 hónappal az eseményt követően a módosított Rankin Skála (mRS) használatával állapították meg (85).

A tanulmány során a következő kimeneteleket vizsgáltuk:

1. Rövid távú kimenetel az eseményt követő 7. napon: az NIHSS pontszám legalább 4 ponttal való csökkenését vagy 0-ra történő csökkenését értékeltük kedvező kimenetelként (neurológiai

javulás), míg az NIHSS pontszám legalább 4 ponttal történő növekedését kedvezőtlen kimenetelnek tekintettük (79, 85).

2. Hosszú távú kimenetel az eseményt követő 90. napon: az mRS 0-1 értékeket definiáltuk kedvező hosszú távú kimenetelként (86).

3. Terápiával összefüggő intracerebrális vérzés (ICH): tünetet képző (SICH) vagy tünetmentes (aSICH) vérzés a European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) II kritériumai szerint, melyet minden beteg esetén a lízist követő napon (lehetőség szerint a 24. órában) CT-vizsgálatok segítségével igazoltak (87).

Etikai engedély

Mindkét tanulmány tervezése a Helsinkai deklarációs egyezmény figyelembevételével történt. A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága, illetve az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is engedélyezte (engedély szám: 3287-2010 RKEB/IKEB, és 4672-2016 RKEB/IKEB és 12698-1/2017/EKU). A vizsgálatról a betegek vagy hozzátartozóik és az egészséges önkéntesek megfelelő tájékoztatásban részesültek és önkéntes, írásos beleegyező nyilatkozatot adtak a tanulmányban való részvételről.

Mintagyűjtés és laboratóriumi vizsgálatok

Minden betegtől perifériás vérmintát gyűjtöttünk felvételkor, az rt-PA infúzió megkezdése előtt és 24 órával a lízis után. A betegek egy részében (n=131, 2011-2013 között) közvetlenül az rt-PA teljes dózisének beadása után is történt mintavétel. A rutin laboratóriumi vizsgálatok (ionok, glükózszint, vese- és májfunkciós vizsgálatok, nagy érzékenységű C-reaktív fehérje mérés, teljes vérkép) standard laboratóriumi módszerek segítségével történtek (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország és Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Németország) a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében.

A specifikus hemosztázis tesztek elvégzéséhez a 0,109 M nátrium-citrátot (Becton Dickinson, Franklin Lane, NJ) ill. nátrium-citrátot, teofillint, adenoztint és dipyridamolt tartalmazó csövekbe (Vacutte CTAD tubes, Greiner Bio-One, Ausztria) gyűjtött vérmintákat a mintavételt követően 1 órán belül feldolgoztuk (kétszer centrifugáltuk 1500 g-vel, szobahőmérsékleten 15 percig). A véralvadás szűrővizsgálatai (protrombin idő, aktivált parciális tromboplastin idő és

trombin idő) és a fibrinogén szint Clauss módszer szerinti meghatározása BCS koagulométerrel történtek a gyári protokoll lépéseit követve (Siemens Healthcare Diagnostic Products, Marburg, Németország). Az FXIII aktivitás és antigén szintek, valamint az α 2-PI aktivitás és antigénszintek meghatározásához a citráttal alvadásgátolt plazmaminták alikvotjait egyedi kóddal jelöltük, és -80 °C-on tároltuk a mérések elvégzéséig.

FXIII aktivitás, FXIII-A₂B₂ antigénszintek és főbb FXIII polimorfizmusok meghatározása

A plazma FXIII aktivitás szinteket ammónia felszabaduláson alapuló teszttel határoztuk meg egy kereskedelmi forgalomban kapható reagenskészlettel (REA-chrom FXIII kit, Reanal-ker, Budapest, Magyarország, referencia tartomány: 69-143%, CV: 3,8%) (88). A FXIII-A₂B₂ antigénszinteket szendvics ELISA módszerrel határoztuk meg, amely a B-alegység elleni biotinizált monoklonális befogó antitestből és az A-alegység elleni peroxidázzal jelölt monoklonális antitestből állt (referencia tartomány: 14-28 mg/L, CV: 2,0%) (89). A DNS izolálást a CTAD alvadásgátolt mintavételi csőbe vett vérminták buffy coat-jából végeztük a QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével, a gyártó leírását követve (Qiagen, Hilden, Németország). A FXIII-A p.Val34Leu (c.103G>T; rs5985), FXIII-A p.Tyr204Phe (c.614A>T; rs3024477), FXIII-B p.His95Arg (c.344G>A; rs6003) és FXIII-B intron K (IVS11 c.1952+144C>G; rs12134960) polimorfizmusait tanszékünk laboratóriumában beállított valós idejű PCR-módszerekkel határoztuk meg fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) detektálás és olvadási görbe elemzése segítségével LightCycler® 480 készüléken (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) (90, 91). Egy beteg esetén jelentősen alacsony felvételi FXIII szintet detektáltunk (<50%), akinél terápia asszociált vérzéses szövődmény alakult ki, ezért a F13A1 exonjaiban, az intron régióiban és a promóter régióiban lévő mutációk azonosítására Sanger szekvenálást végeztünk ABI3130 Genetic Analyzer and Sequencing Analysis 5.4 szoftver segítségével (Termo Fisher Scientific, Carlsbad, CA).

α 2-PI aktivitás, α 2-PI antigénszintek és az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus vizsgálata

Az α 2-PI aktivitást fagyasztott plazmamintákból mértük kromogén tesztben BCS koagulométeren, a gyártó utasításait követve (Berichrom α 2-PI aktivitás, Siemens Healthcare

Diagnostic Products, Marburg, Németország). A vizsgálat elve a következő: az α 2-PI-t tartalmazó betegplazmát inkubáljuk a plazmin feleslegben tartalmazó reagenssel. A plazmin gyorsan inaktiválódik az α 2-PI hatására, és a maradék plazmin aktivitást a plazmin-specifikus kromogén szubsztrát (D-norvalil-ciklohexilalanil-lizil-nitroanilid) hasításán alapuló amidolitikus tesztben mérjük. Az α 2-PI aktivitás fordítottan korrelál az abszorpció váltoásaival 405 nm-en. A totál α 2-PI antigénszintet a tanszékünkön beállított in house ELISA módszerrel mértük (92). Ez a vizsgálat az α 2-PI minden izoformáját kimutatja, és nem befolyásolja a PAP komplexek jelenléte (a plazma totál α 2-PI antigénszintjének referencia tartománya: 48-85 mg/L). Az α 2-PI p.Arg6Trp (rs2070863) polimorfizmust tanszékünk laboratóriumában beállított valós idejű PCR-módszerrel azonosítottuk FRET detektálással és olvadási görbe elemzésével LightCycler R 480 készüléken (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) (93).

Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzésére a Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 26.0 verzió, Chicago, IL) és a GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Inc., La Jolla, CA) szoftvereket használtunk. A tanulmányok során vizsgált adatok normalitásának meghatározására Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk. Folyamatos változók esetén két csoport közötti különbség meghatározására Student-féle t-próbát, vagy Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, párosított adatok esetén párosított t-próbát vagy Wilcoxon párosított tesztet használtunk a normalitástól függően. Több csoport adatainak folyamatos változói esetén ANOVA tesztet Bonferroni post hoc teszttel, vagy Kruskal-Wallis tesztet és Dunn-féle post hoc tesztet használtunk a normalitás próba eredményeinek megfelelően. A folytonos változók közötti összefüggések erősségének vizsgálatához Pearson vagy Spearman féle korrelációs analízist alkalmaztunk. A kategorikus változók közötti különbségek vizsgálata χ^2 tesztel vagy Fisher-féle egzakt tesztel történt az esetszámoktól függően. A Kaplan–Meier módszert alkalmaztuk a betegek túlélési arányának ábrázolására az α 2-PI szintek függvényében. A túlélési görbéket a log-rank tesztel hasonlítottuk össze. Backward bináris logisztikus regressziós modelleket használtunk a mortalitás és a hosszú távú funkcionális kimenetel független prediktorainak meghatározására. A regressziós modell azokat a változókat tartalmazta, melyek az egyváltozós statisztikai modellek esetén szignifikáns eltérést mutattak a különböző kimenetelű csoportok között, vagy irodalmi adatok alapján lényeges tényezőnek bizonyultak a vizsgált kimenet szempontjából. A

logisztikus regressziós analízis eredményeit esélyhányadosban (OR) és 95%-os konfidencia intervallumban (CI) fejeztük ki. A $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Intravénás trombolízissel kezelt akut iszkémiás stroke betegekben mért FXIII szintek ill. gyakori FXIII polimorfizmusok összefüggése a terápia kimenetelével

Vizsgálati populáció

A betegek alapadatait és a stroke kimenetelét az 1. táblázat foglalja össze. Összesen 132 konsekutív, trombolízis kezelésben részesülő AIS beteget vontunk be a vizsgálatba. Az átlagéletkoruk $69,0 \pm 12,2$ év volt, 58,3%-uk férfi volt. A felvételi NIHSS pontszám mediánja 8-nak adódott (interkvartilis tartomány (IQR): 5–14). A TOAST kritériumok szerint a legtöbb beteg esetén a stroke etiológiája nagyér aterotrombózis volt ($n=49$, 37,1%). A tünetek megjelenésétől az rt-PA kezelésig eltelt idő átlaga kevesebb, mint 3 óra volt a kohorszban, és a trombolízis időtartama körülbelül egy óra volt minden egyes beteg esetében. Hét beteg esetében az intravénás trombolitikus kezelést az érvényben lévő standard protokoll szerint intraarteriális trombolízissel egészítették ki; az rt-PA végső dózisa és a trombolízis időtartama nem különbözött szignifikánsan ezeknél a betegeknél a vizsgálati csoport többi tagjához képest. Kedvező rövid távú és hosszú távú funkcionális kimeneteleket 53 (40,2%), illetve 46 (34,8%) esetben figyeltünk meg. A mortalitás a 7. napon, a 14. napon és az esemény utáni 3. hónap végére 5 (3,8%), 18 (13,6%) és 29 (22,0%) eset volt. A terápiával összefüggő vérzéses szövődményt 13 esetben észleltünk, mely 6 esetben tünetképző, 7 esetben pedig tünetmentes komplikáció volt.

Betegek száma, n	132
Férfi, n (%)	77 (58,3)
Kor, év	69,0±12,2
Cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, n (%)	
Artériás hipertónia	101 (76,5)
Pitvarfibrilláció	35 (26,5)
Hiperlipidémia	82 (62,1)
Diabetes mellitus	40 (30,3)
Korábbi stroke, TIA	42 (31,8)
Dohányzás	32 (24,2)
Stroke súlyossága	
NIHSS 0-5	37 (28,0)
NIHSS 6-10	48 (36,4)
NIHSS 11-15	21 (15,9)
NIHSS >15	23 (17,4)
Stroke etiológia (TOAST)	
Kisérbetegség	14 (10,6)
Nagyér ateroszklerózis	49 (37,1)
Kardioembólia	27 (20,5)
Egyéb/ nem meghatározott	42 (31,8)
Tünetek kezdetétől a terápiaig eltelt idő, (perc)	160±46
rt-PA dózisa (mg)	
Intravénás rt-PA (n=125)	68,2±14,9
Intravénás és intraarteriális rt-PA (n=7)	61,6±14,7
Trombolízis időtartama (perc)	64±10
Képekalkotó eljárások adatai, medián (IQR)	
ASPECT felvételtkor	10 (7-10)
ASPECT 24 órával a trombolízist követően	9 (0-10)
Rövid távú funkcionális kimenet	
Kedvező	53 (40,2)
Nincs változás	47 (36,6)
Kedvezőtlen	21 (15,9)
Halál	5 (3,8)
Nem meghatározott	6 (4,5)
Hosszú távú kimenet	
mRS 0-1	46 (34,8)
mRS 2-5	34 (25,8)
mRS 6 (halál)	29 (22,0)
Nem meghatározott	23 (17,4)
Halál a 14. napig	18 (13,6)
Intracerebrális vérzés (ECASS II)	
aSICH	7 (5,3)
SICH	6 (4,5)

1. táblázat. Klinikai alapadatok és a trombolízis kimenetele a vizsgált kohorszban.

Az adatok átlag ± standard deviáció vagy esetszám (százalék) érték formájában vannak feltüntetve, vagy külön meghatározott módon (pl. medián, IQR). n: esetszám, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scal, TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment, rtPA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor, ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT

score, mRS: módosított Rankin skála, ECASS II: European Cooperative Acute Stroke Study II, aSICH: tünetmentes intrakraniális vérzés, SICH: szimptomás intrakraniális vérzés.

A trombolízis hatása a FXIII szintekre

A trombolízis előtti és közvetlenül a trombolízis utáni, valamint az eseményt követő 24. órában meghatározott FXIII aktivitás és antigénszintek a 2. táblázatban láthatók. A betegek jelentős részénél (n=39, 29,5%) a felvételtől FXIII szint referencia tartomány felett volt (felső határérték: 143% vagy 28 mg/l felett). A trombolízist követően a FXIII szint fokozatos csökkenése volt megfigyelhető, közvetlenül a trombolízis után, valamint 24 órával később szignifikánsan alacsonyabb FXIII szinteket detektáltunk a felvételtől értékekhez képest. Erős korrelációt figyeltünk meg az FXIII aktivitás és a FXIII antigénszintek között minden vizsgált alkalommal (felvételtől: Pearson $r=0,915$, $p<0,001$; közvetlenül trombolízis után $r=0,919$, $p<0,001$ és 24 órával az eseményt követően: $r=0,917$, $p<0,001$).

	Trombolízis előtt (A)	Közvetlenül trombolízis után (B)	24 órával trombolízist követően (C)	p* A vs. C
FXIII aktivitás (%)	126,1±36,1	124,7±33,8	116,6±35,0	0,034
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	22,3±7,6	21,4±6,8	19,6±6,4	0,002

2. táblázat. A trombolízis hatása a XIII-as faktor szintekre.

Az adatok átlag ± standard deviációként vannak feltüntetve. *ANOVA és Bonferroni post hoc teszt

A felvételtől FXIII szintek összefüggése a stroke súlyosságával és etiológiájával

A felvételtől mért FXIII szintek nem mutattak összefüggést a stroke súlyosságával amennyiben az NIHSS szerinti kategóriákra osztottuk (3. táblázat), továbbá nem volt megfigyelhető szignifikáns korreláció a FXIII szintek és a felvételtől meghatározott NIHSS pontszámok között sem (Pearson $r=-0,09$, $p=0,28$). A FXIII aktivitás szignifikánsan magasabb volt aterotrombotikus hátterű stroke esetén, mint kardioembóliás eredetű stroke esetén (3. táblázat). A FXIII aktivitás és az antigénszintek gyenge negatív korrelációt mutattak a betegek életkorával (Pearson $r=-0,299$, $p<0,001$ és $r=-0,286$, $p<0,001$). Az FXIII antigén szintje szignifikánsan magasabb volt az aktív dohányzóknál, mint a nem dohányzóknál (24,60 mg/L vs. 21,15±0,9 mg/L, $p<0,05$). A FXIII szintek és a mért rutin klinikai kémiai, hemosztázis és hematológiai paraméterek között nem találtunk szignifikáns összefüggést. A FXIII szintek és az ASPECTS

értékek között sem találtunk szignifikáns korrelációt egyik mintavételi időpont esetén sem. Nem volt összefüggés a felvételkor mért FXIII aktivitás/antigén szintek és a tünetek megjelenésétől a trombolízis kezelésig eltelt idő között (FXIII aktivitás: $r=0,081$, $p=0,186$ és FXIII antigén szint: $r=0,061$, $p=0,251$).

Stroke súlyossága					
	NIHSS 0-5 (n=37)	NIHSS 6-10 (n=48)	NIHSS 11-15 (n=21)	NIHSS >15 (n=23)	p*
FXIII aktivitás (%)	129,7±39,9	126,2±39,6	125,6±26,4	120,5±32,3	0,808
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	23,1±7,8	22,6±9,5	21,8±5,0	21,1±5,4	0,805
Stroke etiológiája					
	Kisér- betegség (n=14)	Nagyér ateroszklerózis (n=49)	Kardio- embólia (n=27)	p† Kisér- betegség vs. Kardioembólia	p† Atero- trombotikus vs. Kardioembólia
FXIII aktivitás (%)	145,6±33,4	130,5±38,3	117,5±24,0	0,038	0,012
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	25,5±7,4	22,8±8,3	20,8±4,8	0,160	0,058

3. táblázat. A felvételi FXIII szintek összefüggése a stroke súlyosságával és etiológiájával.
Az adatok átlag ± standard deviációként vannak feltüntetve. NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, n: esetszám. * ANOVA, †ANOVA és Bonferroni post hoc teszt, ateroszklerotikus eredet: kísérbetegség + nagyér ateroszklerózis

A FXIII szintek és a trombolitikus terápia kimenetelének kapcsolata

A terápia megkezdése előtt, valamint közvetlenül a trombolízis után mért FXIII szintek nem mutattak összefüggést a rövid távú funkcionális kimenetekkel (4. táblázat). Ezzel szemben, trombolízis után 24 órával szignifikánsan alacsonyabb FXIII szintet észleltünk azoknál a betegeknél, akik a kezelést követő első héten elhunytak. A FXIII szintek ezeknél a betegeknél feltűnően alacsonyak voltak, körülbelül 50%-kal alacsonyabbak a más kimenetelű betegeknél mért értékekhez képest. A mortalitás és az alacsony FXIII szint azonban nem járt együtt vérzéses szövődményekkel. Az egyéb kimenetelű betegek FXIII szintjei között nem volt szignifikáns különbség (kedvező kimenetel vs. nincs változás vagy kedvezőtlen kimenetel). A terápia után vérzést szenvedett betegeket az elemzés során külön kezeltük, a feltételezett eltérő patomechanizmusok miatt.

	Kedvező kimenetel (n=51)	Nincs változás (n=42)	Kedvezőtlen kimenetel (n=16)	Halál* (n=4)	Intrakraniális vérzés (n=13)	p† halál vs. egyéb kimenetek	p†‡ halál vs. egyéb kimenetek
Trombolízis előtt (A)							
FXIII aktivitás (%)	127,3±35,2	128,2±41,1	128,1±26,3	100,0±28,7	125,2±36,9	0,129	0,340
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	22,9±8,9	22,4±7,7	22,7±4,4	18,3±5,5	21,6±5,99	0,165	0,416
Közvetlenül trombolízis után (B)							
FXIII aktivitás (%)	123,1±33,2	130,1±35,9	123,3±31,9	111,3±18,8	119,3±38,4	0,256	0,596
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	21,2±6,5	22,4±7,8	20,3±5,5	20,1±4,2	20,8±7,8	0,335	0,702
24 órával trombolízis után (C)							
FXIII aktivitás (%)	115,8±28,2	122,0±40,6	116,0±33,8	60,0±28,9	119,9±40,4	0,003	0,009
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	20,0±5,3	19,9±7,6	19,5±5,8	9,7±5,3	19,1±6,9	0,006	0,014

4. táblázat. A trombolízis előtti és utáni FXIII szintek összefüggése a stroke rövid távú kimenetelével.

*Az adatok átlag ± standard deviációként vannak feltüntetve. A rövid távú kimenetel az eseményt követő 7. napra vonatkozik. n: esetszám. * az akut stroke-hoz köthető haláleset, kivéve az intracerebrális vérzés következtében kialakuló halálozást; †ANOVA és Bonferroni post hoc teszt; †‡adjusztálás korra és nemre a statisztikai modellben*

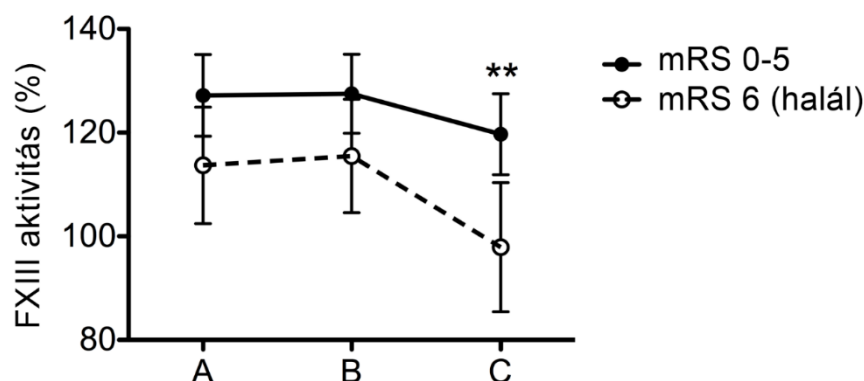
Az alacsony FXIII szintek és az eseményt követő 14. napi mortalitás között szintén összefüggés mutatkozott. A második hét végéig elhunyt betegek kiindulási klinikai és laboratóriumi adatait vizsgálva úgy találtuk, hogy a felvételnél meghatározott NIHSS értékek mellett csak a trombolízis előtt és 24 órával később mért FXIII szintek különböztek szignifikánsan a két csoport között (5. táblázat).

	Túlélők (n=114)	Halál (n=18)	<i>p</i>
Kor, év	68,0 (58,0-79,0)	75,5 (63,0-83,3)	0,130
Férfi	67 (58,8)	11 (61,1)	0,851
Artériás hipertónia	87 (76,3)	13 (73,7)	0,707
Pitvarfibrilláció	28 (24,6)	7 (38,9)	0,201
Hiperlipidémia	73 (64,0)	9 (50,0)	0,254
Diabetes mellitus	32 (28,1)	8 (44,4)	0,160
Korábbi stroke, TIA	39 (34,2)	3 (16,7)	0,138
Dohányzás	28 (24,6)	4 (22,2)	0,830
Szérum glükóz (mmol/L)	6,4 (5,5-7,7)	6,9 (5,6-8,4)	0,490
C-reaktív protein (mg/L)	3,0 (1,5-5,6)	5,2 (2,2-9,6)	0,112
Vérnyomáscsökkentő terápia	75 (65,8)	12 (66,7)	0,942
Trombocitagátló terápia	48 (42,1)	10 (55,5)	0,285
Trombolízis megkezdésig eltelt idő (perc)	157,0 (125,0-180,0)	144,0 (130,0-212,0)	0,605
Kardioembóliás stroke	23 (20,2)	4 (22,2)	0,841
NIHSS felvételnél	8,0 (5,0-13,0)	14,0 (8,0-23,0)	0,005
ASPECTS felvételnél	10,0 (9,0-10,0)	9,5 (9,0-10,0)	0,591
FXIII aktivitás (%) trombolízis előtt	129,0±36,0	107,4±31,5	0,017
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L) trombolízis előtt	22,9±7,8	18,6±4,8	0,026
FXIII aktivitás (%) közvetlenül trombolízis után	127,1±33,7	110,9±32,0	0,061
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L) közvetlenül trombolízis után	21,8±6,8	18,5±6,4	0,056
FXIII aktivitás (%) 24 órával a trombolízis után	119,9±33,6	91,3±36,5	0,004
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L) 24 órával a trombolízis után	20,2±6,2	15,1±6,5	0,005

5. táblázat. Klinikai alapadatok és FXIII szintek a 14. napi mortalitás alapján a vizsgált kohorszban.

Az adatok átlag ± standard deviáció, medián (IQR) vagy esetszám (százalék) érték formájában vannak feltüntetve. ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT score, FXIII: XIII-as faktor, n: esetszám, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale

Hasonló eredményeket figyeltünk meg, amikor a FXIII szinteket a stroke hosszú távú (esemény után 3 hónappal) funkcionális kimenetele tekintetében vizsgáltuk (5. ábra). Az FXIII szint a lízis után 24 órával szignifikánsan alacsonyabb volt azoknál betegeknél, akik az eseményt követő 3. hónap végéig elhunytak (mRS 6).



5. ábra. A FXIII szintek változása a trombolízis során a különböző hosszú távú kimenetelű betegek esetén.

A FXIII aktivitás értékek átlag (kör) és 95%-os konfidencia intervallum (bajusz) formájában vannak feltüntetve trombolízis előtt (A), közvetlenül a trombolízis után (B), és 24 órával a trombolízist követően (C) a különböző hosszú távú kimenetelű betegek esetén. A fekete körök reprezentálják a harmadik hónap végén mRS 0-5 értékekkel rendelkező betegeket (n=80), a fehér körök a harmadik hónap végére elhunyt betegek (mRS 6, n=29) értékeit mutatják. ** $p < 0,01$, mRS 0-5 vs. mRS 6 (Student's t teszt)

Annak vizsgálatára, hogy a trombolízis után 24 órával mért alacsony FXIII szintek független előrejelzői-e a betegek rövid és hosszú távú mortalitásának, többszörös logisztikus regressziós (backward) analízist végeztünk, mely magába foglalta az összes, a kimenetelre nézve potenciálisan releváns kockázati ill. befolyásoló tényezőt (6. táblázat). Eredményeink alapján a felvételtkor meghatározott NIHSS pontszám a 14. napi mortalitás (OR: 1,12; 95% CI: 1,02-1,23, $p=0,013$) és a 90. napi mortalitás (OR: 1,16; 95% CI: 1,05-1,28, $p=0,004$) független előrejelzőjének bizonyult. A felvételtkor NIHSS mellett a trombolízis után 24 órával a legalacsonyabb kvartilisben lévő FXIII szintek a rövid távú mortalitás független előrejelzőjének bizonyultak (OR: 4,95; 95% CI: 1,31–18,68, $p=0,018$). Ugyanakkor a trombolízis után 24 órával mért alacsony FXIII szint nem bizonyult a 90. napi halálozás független előrejelzőjének (OR: 1,88; 95% CI: 0,55-6,41, $p=0,311$).

	OR (95%CI)	p
Halál a 14. napig (n=18)		
NIHSS felvételtkor	1,12 (1,02- 1,23)	0,013
FXIII aktivitás az alsó kvartilisben 24 órával a trombolízist követően	4,95 (1,31- 18,68)	0,018
Halál a 3. hónap végéig (n=29)		
NIHSS felvételtkor	1,16 (1,05- 1,28)	0,004
FXIII aktivitás az alsó kvartilisben 24 órával a trombolízist követően	1,88 (0,55- 6,41)	0,311

6. táblázat. A rövid ill. hosszú távú halálozás független prediktorai a vizsgált kohorszban.

A backward többszörös regressziós modell elemei: kor, nem, NIHSS felvételtkor, aktív dohányzás, C-reaktív protein szint és FXIII aktivitás az alsó kvartilisben 24 órával a trombolízist követően. n: elemszám, CI: konfidencia intervallum, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale

Korábbi feltételezésünkkel ellentétben a lízist követően intrakraniális vérzést szenvedett betegeknel (n=13, 4. táblázat) a trombolízis során tapasztalt FXIII szintek a szövődménymentes betegeknel megfigyelt szintekhez hasonlóan alakultak. Annak ellenére, hogy csökkenő tendencia volt megfigyelhető a közvetlenül trombolízis után mért értékek esetében, a FXIII aktivitás ill. antigénszintek egyetlen mért időpontban sem mutattak szignifikáns különbséget a vérzést nem mutató betegek és a SICH vagy aSICH szövődményt szenvedett betegek között (7. táblázat). Ebben a kohorszban csak egy terápiával összefüggő vérzést szenvedett betegnel volt referencia tartomány alatti a FXIII szint (FXIII aktivitás felvételtkor: 45,9%, közvetlenül trombolízis után: 50,2%, 24 órával a trombolízist követően: 39,9%). A heterozigóta FXIII-A hiányt ebben a betegben az F13A1 gén direkt fluoreszcens szekvenálásával zártuk ki. Ezen egyetlen beteg kivételével az FXIII szintek a referencia tartományon belül vagy a felett voltak minden mért időpontban azoknál a betegeknel, akiknel a terápiához társultan vérzéses komplikáció alakult ki. Egy beteg halt meg a trombolízist követő SICH miatt az 1. napon, de ebben az esetben is a FXIII szint referencia tartományon belül volt (FXIII aktivitás felvételtkor: 107,7%, közvetlenül trombolízis után: 104,5%).

	Nincs vérzés (n=119)	aSICH (n=7)	SICH (n=6)	p* nincs vérzés vs. SICH	p** nincs vérzés vs. aSICH+SICH
Trombolízis előtt (A)					
FXIII aktivitás (%)	126,2±36,1	131,5±22,5	117,8±50,3	0,588	0,930
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	22,4±7,8	23,5±4,9	19,1±7,1	0,315	0,674
Közvetlenül trombolízis követően (B)					
FXIII aktivitás (%)	125,3±33,4	123,6±25,1	114,3±52,2	0,444	0,547
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	21,4±6,7	22,4±6,3	19,2±10,1	0,437	0,807
24 órával a trombolízis után (C)					
FXIII aktivitás (%)	116,3±34,6	129,9±30,1	102,5±54,6	0,460	0,712
FXIII-A ₂ B ₂ (mg/L)	19,6±6,4	21,7±3,8	16,4±10,1	0,350	0,903

7. táblázat. FXIII szintek a trombolízis során és a lízist követően kialakuló vérzéses szövődmények összefüggése.

Az adatok átlag ± standard deviáció formájában vannak feltüntetve. aSICH: aszimptómás intrakraniális vérzés, SICH: szimptómás intrakraniális vérzés. *ANOVA és Bonferroni post hoc teszt, ** Student's t teszt

A FXIII gyakori polimorfizmusai és a trombolitikus terápia kimenetele közötti összefüggések vizsgálata

Az európai populációban leggyakoribb FXIII-A és FXIII-B polimorfizmusok allélfrekvenciái ebben az AIS-es betegkohorszban nem különböztek szignifikánsan az általunk korábban vizsgált kontrollcsoportokhoz képest (91, 94). A korábbi irodalmi adatokkal összehangban (48) a FXIII-A p.Val34Leu, FXIII-A p.Tyr204Phe és FXIII-B p.His95Arg polimorfizmusok nem befolyásolták a FXIII szinteket. A FXIII-B intron K nt29756 G allél hordozói esetén szignifikánsan alacsonyabb FXIII szint volt megfigyelhető a nem hordozókhöz képest (FXIII aktivitás: $114,5 \pm 30,9\%$ vs. $130,46 \pm 36,9\%$, $p=0,021$, illetve FXIII antigén szint: $19,26$ vs. $23,5 \pm 0,75$ mg/L, $p=0,004$), de az ismert befolyásoló tényezőkre (életkor, CRP, dohányzás) való statisztikai adjusztálás után a különbségek nem voltak szignifikánsak a csoportok között. A vizsgált FXIII polimorfizmusok egyike sem mutatott szignifikáns összefüggést a stroke súlyosságával, a terápia kedvezőtlen rövid vagy hosszú távú kimenetelével, a terápiával összefüggő SICH kialakulásával és a mortalitással (8. táblázat). A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus esetében megfigyelhető volt ugyan egy tendencia, mely szerint a FXIII-A 34Leu allél hordozása védő hatású lehet a kedvezőtlen rövid távú kimenetellel szemben (OR: 0,33; 95% CI: 0,09-1,10), de az összefüggés ennél az esetszámnál statisztikailag nem volt szignifikáns ($p=0,072$).

	FXIII-A p.Val34Leu	FXIII-B p.His95Arg	FXIII-B intron K nt29756 C>G
	OR (95% CI), p-érték		
Stroke súlyossága (NIHSS>5)*	0,70 (0,32-1,54), 0,379	2,10 (0,73-6,03), 0,167	1,34 (0,56-3,25), 0,514
ICH†	2,72 (0,79-9,35), 0,112	0,17 (0,02-1,49), 0,111	0,41 (0,05-3,55), 0,673
SICH†	1,25 (0,17-8,80), 0,823	1,00 (0,09-10,97), 0,996	0,18 (0,01-3,34), 0,185
Kedvezőtlen rövid távú kimenet (Δ NIHSS \geq 4)†	0,33 (0,09-1,10), 0,072	0,76 (0,22-2,66), 0,665	1,14 (0,38-3,33), 0,811
Kedvezőtlen hosszú távú kimenet (mRS>1)†	1,33 (0,50-3,52), 0,568	2,65 (0,85-8,26), 0,093	1,26 (0,45-3,50), 0,659
Halál a 14. napig†	0,61 (0,17-2,10), 0,434	1,84 (0,57-5,92), 0,305	1,12 (0,28-4,36), 0,871
Halál a 3. hónap végéig†	0,45 (0,14-1,44), 0,178	1,02 (0,30-3,42), 0,975	0,91 (0,29-2,82), 0,864

8. táblázat. FXIII polimorfizmusok, a stroke súlyossága és a trombolízis kimenetele.

FXIII-A: XIII-as faktor A alegység, FXIII-B: XIII-as faktor B alegység, OR: odds ratio, CI: konfidencia intervallum, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, ICH: intrakraniális vérzés (aszimptómás+ szimptómás), SICH: tünetképző intrakraniális vérzés, Δ NIHSS: az NIHSS érték változása a 7. napra, mRS: módosított Rankin skála. A rövid ill. hosszú távú kimenetelt a 7. napon ill. a 3. hónap végén határoztuk meg. *ANOVA és Bonferroni post hoc teszt, * korra és nemre adjusztálva, † korra, nemre, felvételtől NIHSS értékre adjusztálva

Az α 2-PI szintek és az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus összefüggése akut iszkémiás stroke-ot elszenvedett betegek intravénás trombolízis kezelésének kimenetelével

Vizsgálati populáció

Prospektív obszervációs tanulmányunkba összesen 421 intravénás trombolízis kezelésben részesülő AIS beteg került beválogatásra. A betegek alapadatait és a stroke kimenetelét a 9. táblázat mutatja be. A kohorsz medián életkora 68 (IQR: 60-77) év volt, a betegek 57,2%-a férfi volt. A felvételtkor NIHSS érték mediánja 7 volt (IQR: 4-11). A tünetek megjelenésétől az rt-PA kezelésig eltelt idő mediánja 150 (IQR: 115-185) perc volt. A leggyakoribb cerebrovaszkuláris rizikófaktor a magas vérnyomás volt (82,2%). Kedvező rövid és hosszú távú kimenetel a betegek 45,2%-ánál, illetve 48,6%-ánál volt megfigyelhető (a lízis után vérzést szenvedett eseteket külön csoportként kezelve). Terápia asszociált vérzéses szövődmény 34 betegnél (8,1%) fordult elő, 14 esetben (a teljes kohorsz 3,3 %-a) volt SICH, 20 betegnél (a teljes kohorsz 4,8%-a) pedig aSICH komplikáció alakult ki.

Betegek száma	421
Kor, év	68 (60-77)
Férfi, n (%)	241 (57,2)
Stroke súlyossága, NIHSS	7 (4-11)
Cerebrovaszkuláris rizikó faktorok, n (%)	
Artériás hipertónia	346 (82,2)
Pitvarfibrilláció	86 (20,4)
Diabetes mellitus	118 (28,0)
Hiperlipidémia	267 (63,4)
Dohányzás	128 (30,4)
Előző stroke, TIA	114 (27,1)
BMI, kg/m ²	27,4 (24,5-31,7)
Gyógyszerek kórházi felvételtkor, n (%)	
Vérnyomáscsökkentő	209 (49,6)
Trombocitagátló	173 (41,1)
Antikoaguláns	22 (5,2)
Lipidcsökkentő	110 (26,1)
Antidiabetikus terápia	69 (16,4)
Laboratóriumi paraméterek felvételtkor	
INR	0,98 (0,93-1,02)
APTI, sec	27,8 (25,9-30,7)
Fehérvérsejtszám, G/L	7,9 (6,3-9,7)

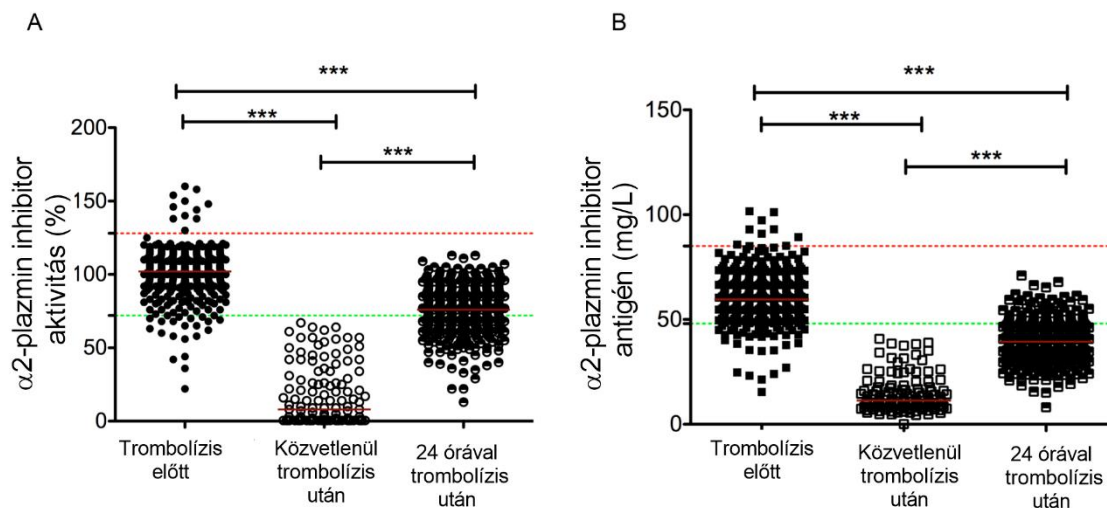
Trombocitaszám, G/L	217 (180-262)
Szérum glükóz, mmol/L	6,5 (5,6-8,1)
hsCRP, mg/L	2,9 (1,6-6,0)
Kreatinin, μ mol/L	75,0 (64,0-90,0)
D-dimer, mg/L	0,75 (0,46-1,34)
Plazminogén aktivitás, %	108,0 (92,0-128,0)
Fibrinogén, g/L	3,9 (3,3-4,6)
α 2-plazmin inhibitor aktivitás, %	102 (93,0-111,0)
α 2-plazmin inhibitor antigén, mg/L	59,6 (54,0-67,3)
<hr/>	
Stroke etiológia (TOAST), n (%)	
Nagyér ateroszklerózis	146 (34,8)
Kisérbetegség	76 (18,0)
Kardioembólia	54 (12,8)
Egyéb/nem meghatározott	145 (33,4)
<hr/>	
Képzőanyagok, n (%)	
ASPECTS felvételnél	
0-7	6 (1,4)
8-10	268 (63,7)
ASPECTS 24 órával trombolízis után	
0-7	50 (11,9)
8-10	225 (53,4)
<hr/>	
Trombolízis terápia (i.v. rt-PA)	
Trombolízis ideje, perc	60,0 (60-60)
Tünetek jelentkezésétől a terápiáig eltelt idő, perc	150 (115-185)
rt-PA dózis, mg	68,0 (58,0-81,0)
<hr/>	
Kimenetek n (%)	
Rövid távú kimenetel (Δ NIHSS 7. nap) *	
Kedvező (legalább -4 pont vagy 0 érték)	175 (43,7)
Nem változott (\pm 3 pont)	159 (37,8)
Kedvezőtlen (legalább +4 pont vagy halál)	46 (10,9)
Nem meghatározott	7 (1,7)
Hosszú távú kimenetel (mRS 90. nap) *	
Kedvező (mRS 0-1)	188 (44,7)
Kedvezőtlen (mRS 2-6)	157 (37,2)
Nem meghatározott	42 (10,0)
Intrakraniális vérzés, ICH (ECASS II, 24h)	
Nincs vérzés	387 (91,9)
aSICH	20 (4,8)
SICH	14 (3,3)

9. táblázat. Klinikai alapadatok és a trombolízis kimenetele a vizsgált kohorszban.

Az adatok medián (IQR) vagy esetszám (százalék) értékek formájában vannak feltüntetve. aSICH: tünetmentes intrakraniális vérzés, APTI: aktivált parciális tromboplasztin idő, ASPECTS: Alberta Stroke Program Early CT score, BMI: body mass index, ECASS II: European Cooperative Acute Stroke Study II, hsCRP: magas szenzitivitású C reaktív protein meghatározás, ICH: intrakraniális vérzés, INR: nemzetközi normalizált ráta, mRS: módosított Rankin skála, n: esetszám, NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale, SICH: szimptomás intrakraniális vérzés, rt-PA: rekombináns szöveti plazminogén aktivátor, TIA: tranzienis iszkémiás attack, TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *kivéve a lízist követően vérzést szenvedett betegeket (n=34)

A trombolízis hatása a $\alpha 2$ -plazmin inhibitor szintekre

Az $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigénszintek a trombolízis előtt, közvetlenül utána és 24 órával a lízist követően a 6. ábrán láthatók. A felvételtől $\alpha 2$ -PI aktivitás és az antigénszintek meglepően széles eloszlást mutattak, de a betegek többsége esetén az $\alpha 2$ -PI szintek a referencia határértékeken belül voltak. Mind az $\alpha 2$ -PI aktivitás, mind az antigénszintek szignifikáns csökkenést mutattak közvetlenül a trombolízis után, jelezve, hogy a terápia során a képződött szabad plazmin gyorsan komplexet alkot az $\alpha 2$ -PI-ral. Amint az a 6. ábrán látható, közvetlenül a trombolízis után az $\alpha 2$ -PI aktivitás és az antigénszint minden betegnél a referencia tartomány alatt volt ($\alpha 2$ -PI aktivitás medián: 8 [IQR: 1-29] %; $\alpha 2$ -PI antigén medián: 11,3 [IQR: 8,2-17,3] mg/L).

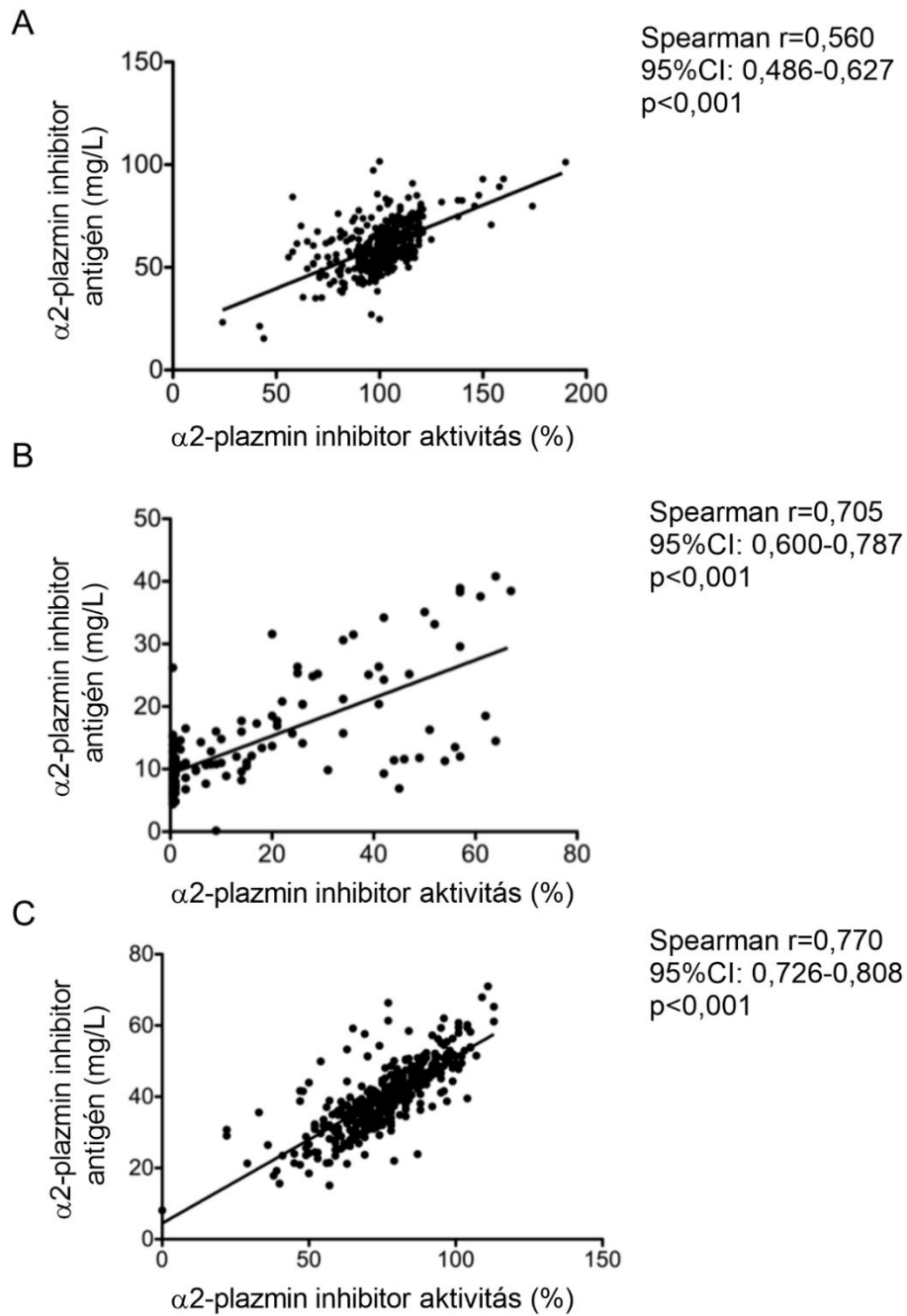


6. ábra. $\alpha 2$ -PI aktivitás (A) és antigén szintek (B) AIS betegekben a trombolízis során.

Az $\alpha 2$ -PI aktivitás (kör) és antigén (négyzet) szinteket felvételtől (fekete alakzatok), közvetlenül trombolízis után (fehér alakzatok) és 24 órával a trombolízist követően (fekete-fehér alakzatok) határoztuk meg. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis és Dunn's post hoc teszt)

Huszonnégy órával a trombolízis után az $\alpha 2$ -PI aktivitás és az antigénszintek jelentősen megemelkedtek, de a betegek jelentős hányadában még mindig az alsó referencia határtérték alatt maradtak ($\alpha 2$ -PI aktivitás medián: 76 [66-86] %; $\alpha 2$ -PI antigén medián: 39,4 [IQR: 34,1-46,1] mg/L). Az $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigénszintek között a legerősebb korrelációt ($r=0,770$, 95% CI: 0,723-0,808, $p < 0,001$) a trombolízis után 24 órával mért plazmamintákból figyeltük meg (7. ábra). Érdekes módon ebben a kohorszban a felvételtől meghatározott $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigénszintek közötti összefüggést találtuk a leggyengébbnek ($r=0,560$, 95% CI:

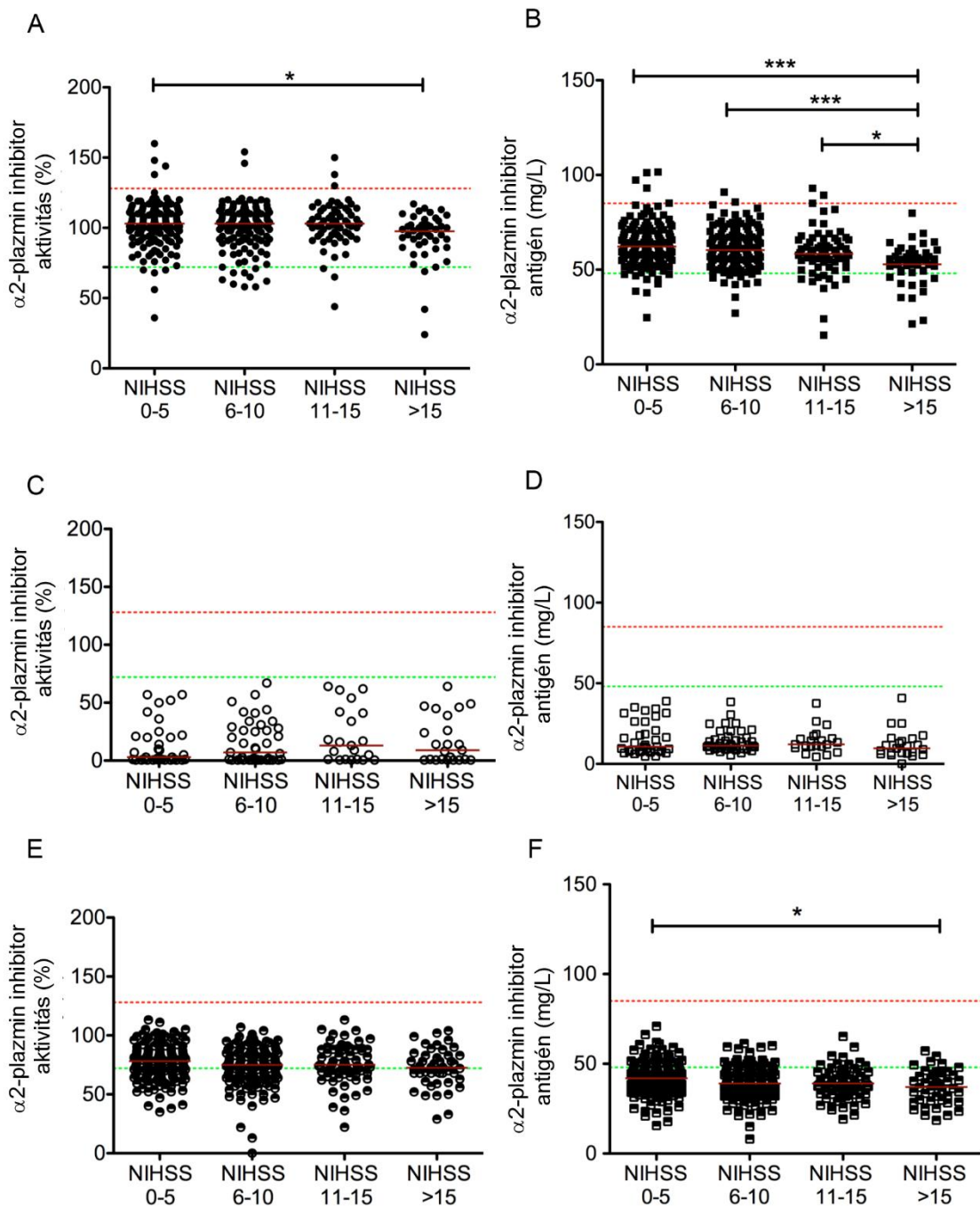
0,486-0,627, $p < 0,001$). A felvételi korai klinikai és laboratóriumi paraméterek közül (a 9. táblázatban felsoroltak szerint) mind az $\alpha 2$ -PI aktivitás, mind az antigénszintek gyenge, de szignifikáns negatív korrelációt mutattak az életkorral (Spearman r : -0,2244; 95% CI: -0,3168 és -0,1278, $p < 0,001$ és r : -0,3908; 95% CI: -0,4739 és -0,3008 között, $p < 0,001$). Az $\alpha 2$ -PI aktivitás szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a felvételi korai fibrinogén szinttel ($r = 0,3623$; 95% CI: 0,2723-0,4460, $p < 0,001$), ez az összefüggés az antigén szintek esetén nem volt megfigyelhető. Az $\alpha 2$ -PI aktivitás és $\alpha 2$ -PI antigén szintek szignifikánsan magasabbak voltak az aktív dohányosokban a nem dohányzókhöz képest a betegek felvételekor ($\alpha 2$ -PI aktivitás: medián: 106 [98-114] % vs. 101 [92-109,5] %, $p = 0,0024$, $\alpha 2$ -PI antigén: medián: 61,0 [56,4-70,4] mg/L vs. 58,7 [52,6-66,9] mg/L $p = 0,0135$). Az aktív dohányosokban látott magasabb $\alpha 2$ -PI szint 24 órával a trombolízist követően is megfigyelhető volt ($\alpha 2$ -PI aktivitás: medián: 81 [69-90] % vs. 75 [65-83] %, $p = 0,0005$, $\alpha 2$ -PI antigén: medián: 43,4 [35,7-48,7] mg/L vs. 38,4 [33,2-44,8] mg/L, $p = 0,0011$). Az $\alpha 2$ -PI aktivitás és $\alpha 2$ -PI antigén szintek a betegek felvételekor szignifikánsan magasabbak voltak nőkben a férfiakhoz képest ($\alpha 2$ -PI aktivitás: medián: 105 [97-114] % vs. 100 [92-108] %, $p < 0,001$, $\alpha 2$ -PI antigén: medián: 60,9 [55,1-69,1] mg/L vs. 58,6 [52,9-66,7], $p = 0,0363$).



7. ábra. $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigén szintek közötti korreláció AIS betegekben trombolízis előtt (A), közvetlenül a trombolízis után (B) és 24 órával a trombolízist követően (C).

A felvételi α 2-PI szintek és az akut iszkémiás stroke súlyosságának, etiológiájának kapcsolata

A felvételi α 2-PI szintek szignifikáns összefüggést mutattak a stroke súlyosságával (8. ábra). Azok a betegek, akik a felvételi NIHSS értékük alapján súlyosabb stroke-ban szenvedtek, szignifikánsan alacsonyabb α 2-PI szintet mutattak (8 A. és B. ábra). Fordított, lépcsőzetes összefüggés volt megfigyelhető a stroke súlyossága és a felvételi α 2-PI antigénszintek között (8 B. ábra), hasonló, de gyengébb összefüggést találtunk a lízis után 24 órával vett minták esetén (8 F. ábra). A trombolízis után 24 órával meghatározott α 2-PI szintek nem mutattak szignifikáns összefüggést a stroke súlyosságával (8 E. és F. ábra). A felvételi α 2-PI antigénszintek kísér infarktusok esetén voltak a legmagasabbak, míg a legalacsonyabb szintek kardioembóliás eredetű stroke-okban voltak megfigyelhetők (α 2-PI antigén medián: 61,8 [IQR: 56,3-72,8] mg/L vs. 56,6 [IQR: 52,3- 64,2] mg/L, $p=0,024$).

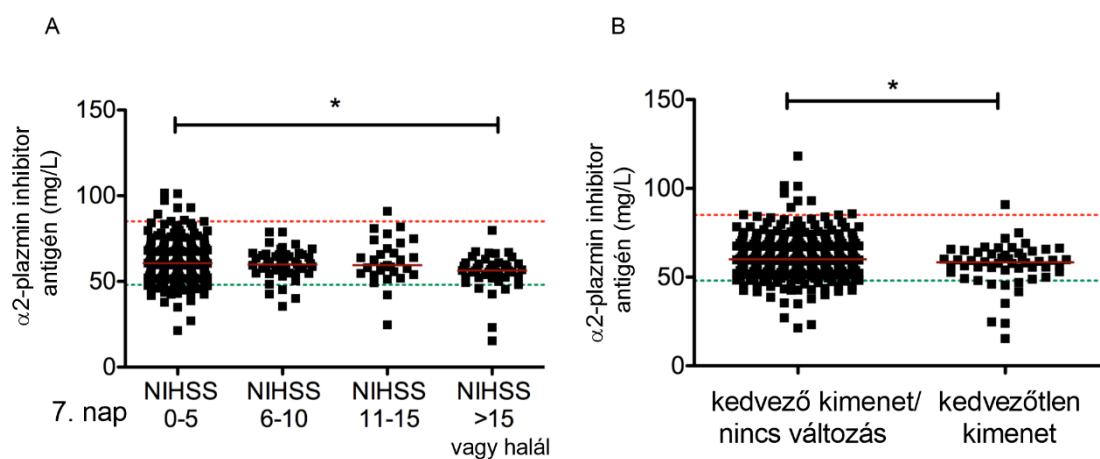


8. ábra. A trombolízis során különböző időpontokban mért $\alpha 2$ -PI aktivitás és antigén szintek és a stroke súlyosságának (NIHSS) kapcsolata AIS betegekben.

Az $\alpha 2$ -PI aktivitás szinteket a stroke súlyossága szerinti csoportokba sorolva trombolízis előtt fekete körök (A), közvetlenül trombolízis után fehér körök (C), 24 órával a trombolízist követően fekete-fehér körök (E) mutatják. Az $\alpha 2$ -PI antigén szinteket a stroke felvételtkor súlyossága szerint csoportosítva a trombolízis előtt fekete négyzetek (B), közvetlenül trombolízis után fehér négyzetek (D), 24 órával a trombolízist követően fekete-fehér négyzetek (F) mutatják. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis és Dunn's post hoc teszt)

Az $\alpha 2$ -PI szintek és a trombolitikus terápia kimenetelének kapcsolata

A felvételi $\alpha 2$ -PI antigénszintek szignifikáns összefüggést mutattak a stroke rövid távú kimenetelével (9. ábra). Szignifikánsan alacsonyabb felvételtkori $\alpha 2$ -PI antigénszinteket találtunk a lízist követő 7. napon súlyosabb stroke-ban szenvedő betegeknél (9 A. ábra). Azoknál a betegeknél, akiknél a lízis után 7 nappal kedvezőtlen kimenetellel rendelkeztek, a felvételtkori $\alpha 2$ -PI antigénszintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak azokhoz képest, akik állapota javult, vagy nem mutattak változást (kedvező kimenetel/változatlan csoport medián: 60,4 [IQR: 54,5-68,8] mg/L vs. kedvezőtlen kimenetelű csoport medián: 58,0 [IQR: 49,6-64,1] mg/L, $p=0,045$) bár meg kell jegyezni, hogy mindkét csoport esetén a medián értékek a referencia tartományban voltak, és a különbség a csoportok között marginálisnak mondható (9 B. ábra).

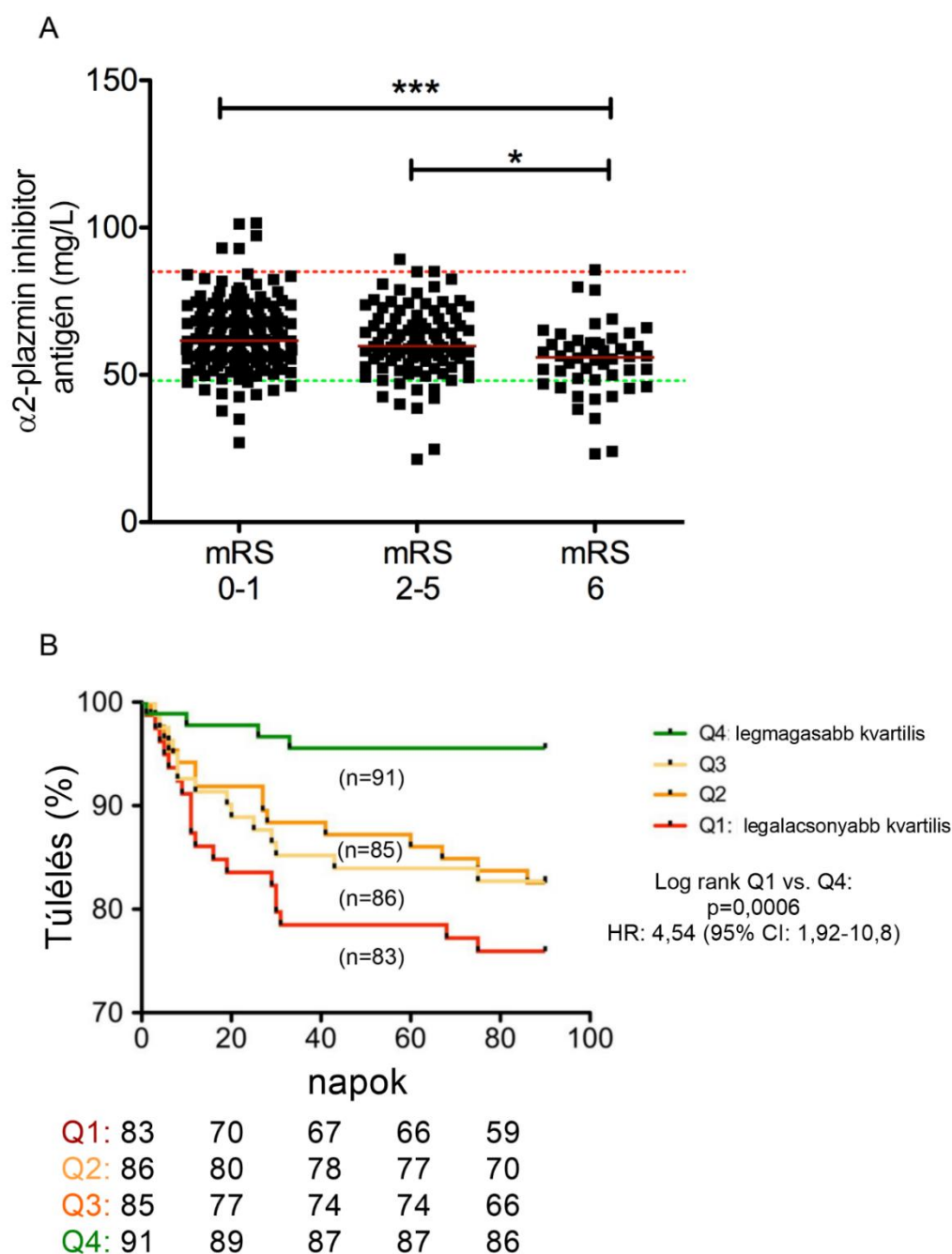


9. ábra. A trombolízis előtti $\alpha 2$ -plazmin inhibitor ($\alpha 2$ -PI) antigén szintek és a trombolízis rövid távú kimenetelének kapcsolata.

Az $\alpha 2$ -PI antigén szinteket a 7. napon meghatározott stroke súlyosság (NIHSS) szerint (A) vagy az NIHSS 7. napig bekövetkező változása szerint kategorizáltuk. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. NIHSS, National Institute of Health Stroke Scale. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis és Dunn's post hoc teszt)

A trombolízis utáni $\alpha 2$ -PI antigénszint és az $\alpha 2$ -PI aktivitás nem mutatott összefüggést a rövid távú kimenetellel. Hasonlóképpen, a hosszú távú funkcionális kimenetellel és a 90 napos mortalitás adatokkal csak a felvételtkori $\alpha 2$ -PI antigénszintek mutattak összefüggést (10 A. ábra). Megjegyzendő, hogy a trombolízis előtti és utáni $\alpha 2$ -PI aktivitás ill. $\alpha 2$ -PI antigénszintek csökkenésének mértéke nem mutatott összefüggést a kimenetelekkel. Azok a betegek, akik elhunytak (mRS 6) vagy kedvezőtlen hosszú távú kimenetellel rendelkeztek (mRS 2-5),

szignifikánsan alacsonyabb felvételi α 2-PI antigénszintet mutattak az esemény után 90 nappal legkedvezőbb kimenetelű betegekhez képest (mRS 0-1 medián: 61,6 [IQR: 55,9-70,5] mg/L vs. mRS 2-5 medián: 59,7 [IQR: 54,5-69,1] mg/L vs. mRS 6 medián: 56,0 [IQR: 48,5-61,0] mg/L, $p < 0,001$). Kaplan–Meier túlélési analízis során úgy találtuk, hogy azok a betegek, akik a kórházi felvételnél a legfelső kvartilisnek megfelelő α 2-PI antigénszinttel rendelkeztek, szignifikánsan jobb túlélést mutattak, mint azok, akiknél az α 2-PI antigénszint a legalacsonyabb kvartilisben volt (HR: 4,54; 95%CI: 1,92-10,8, $p < 0,001$) (10 B. ábra).



10. ábra. A trombolízis előtti α 2-PI antigén szintek és a trombolízis hosszú távú kimenetelének kapcsolata (A). Kaplan–Meier túlélési görbék a trombolízis előtti α 2-PI antigén szintek kvartilisei szerint (B).

Az AIS betegek felvételekor mért α 2-PI antigén szinteket a 3. hónap végén meghatározott módosított Rankin skála (mRS) szerint kategorizáltuk (A). Az mRS 0-1 értékeket tekintettük kedvező kimenetelnek, az mRS 6 a mortalitást jelöli. A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis és Dunn's post hoc teszt). A Kaplan Meier túlélési görbéket a trombolízis előtti α 2-PI antigén szintek kvartilisei szerint (Q1-Q4) képeztük (B). A rizikónak kitett esetszámok (number at risk) az ábra alatti táblázatban láthatóak az egyes kvartiliseknek megfelelően. A felső kvartilisbe (Q4, zöld vonal),

középső kvartilisekbe (Q3 és Q2, világos ill. sötét narancs vonalak), és a legalsó kvartilisbe (Q1, piros vonal) tartozó eredményeket a következő határértékek szerint csoportosítottuk: 67,4 mg/L, 60 mg/L, és 54,1 mg/L α 2-PI antigén szint. HR, hazard ratio (relatív kockázat)

Backward bináris logisztikus regressziós modellt használva (1. modell: hiperlipidémia, BMI, diabetes mellitus, nem és CRP) kimutattuk, hogy a felvételkor a legalacsonyabb kvartilisben lévő α 2-PI antigénszint szignifikáns előrejelzője a kedvezőtlen (mRS 3-6) hosszú távú kimenetelnek (OR: 2,10; 95%CI: 1,21-3,66, p=0,008) és halálozásnak (mRS 6) 3 hónappal a trombolízis után (OR: 2,22, 95%CI: 1,15-4,31, p=0,018) (10. táblázat). Amikor azonban az életkort és az NIHSS-t is bevettük a modellekbe (2. és 3. modell), az α 2-PI antigénszint hatása már nem bizonyult szignifikánsnak, és csak az életkor és az NIHSS maradt fenn a modellben mindkét kimenetel független prediktoraként.

	Kedvezőtlen kimenet (mRS 0-1 vs. mRS 2-6)			Halál a stroke-ot követő 3. hónap végéig (mRS 0-5 vs. mRS 6)		
	OR	95%CI	p	OR	95%CI	p
Modell 1[§]						
α 2-PI antigén alsó kvartilis	2,10	1,21-3,66	0,008	2,22	1,15-4,31	0,018
Diabetes mellitus	2,18	1,29-3,68	0,004			
CRP				1,02	0,99-1,04	0,099
Modell 2[#]						
INR	14,08	0,70-283,44	0,084			
Diabetes mellitus	2,10	1,22-3,62	0,008			
Kor	1,05	1,03-1,07	<0,001	1,11	1,07-1,15	<0,001
Hipertónia				0,27	0,10-0,70	0,007
CRP				1,03	1,00-1,05	0,028
Modell 3[†]						
Kor	1,04	1,02-1,06	<0,001	1,08	1,04-1,27	<0,001
NIHSS	1,17	1,10-1,24	<0,001	1,17	1,09-1,25	<0,001
Diabetes mellitus	2,05	1,16-3,62	0,014			
Hipertónia				0,33	0,11-0,99	0,048

10. táblázat. A kedvezőtlen hosszú távú kimenet és a 3. hónap végéig bekövetkező halálozás független prediktorai a vizsgált kohorszban. A táblázat a backward többszörös regressziós modell utolsó lépéseit mutatja.

A modellek kiindulási elemei:

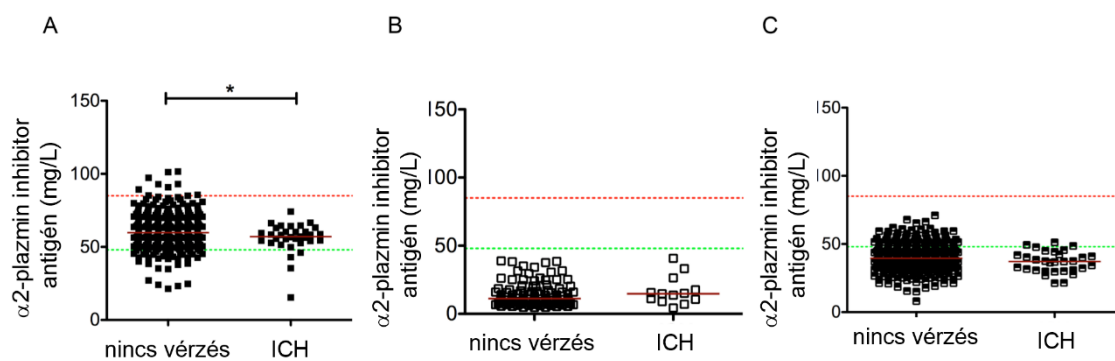
Modell 1[§]: nem, hiperlipidémia, BMI, diabetes mellitus, C reaktív protein szint és α 2-PI antigén a legalsó kvartilisben (határérték: <54,1 mg/L).

Modell 2[#]: Modell 1 és kor

Modell 3[†]: Modell 2 és NIHSS

95%CI, 95%-os konfidencia intervallum; CRP, C-reaktív protein; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; OR, odds ratio; mRS, módosított Rankin skála

A lízis után ICH-t szenvedő betegeknél (n=32) a felvételi α 2-PI antigén szint szignifikánsan alacsonyabb volt azokhoz képest, akiknél nem volt vérzéses szövődmény (11 A. ábra). Ez az összefüggés nem volt megfigyelhető a betegek lízis utáni mintáiban (11 B. és C. ábra) ill. az α 2-PI aktivitás esetén egyik mért időpontban sem. A felvételtől medián α 2-PI antigénszintek közötti különbség, bár szignifikáns, de csekély mértékű volt a lízist követően agyvérzést szenvedett ill. a szövődménymentes betegek között (nincs ICH medián: 59,8 [IQR: 54,0-68,0] mg/L vs. ICH: 57,0 [IQR: 53,4-61,7] mg/L, p=0,036). Nem volt megfigyelhető szignifikáns korreláció a lízis utáni becsült hematóma térfogata és a felvételtől α 2-PI antigén szintje között (r=0,207; 95% CI: -0,176-0,536, p=0,272). Az α 2-PI antigén ill. aktivitás szintek nem különböztek a SICH és aSICH alcsoportokban a vizsgált időpontokban. A várakozásoknak megfelelően az NIHSS szignifikánsan magasabb volt az ICH-t szenvedett betegeknél, a vérzéses komplikáció nélküli betegekhez képest (medián: 12 [IQR: 7-32] vs. 6,5 [IQR: 4-36], p<0,001).



11. ábra. A trombolízis előtti (A) közvetlenül lízis utáni (B) ill. 24 órával a lízis utáni (C) α 2-PI antigén szintek és a trombolízist követő agyvérzés (ICH) kialakulásának kapcsolata.

A piros szaggatott vonal a referencia tartomány felső, a zöld szaggatott vonal a referencia tartomány alsó határát mutatja. A medián értékeket piros vízszintes vonalak jelölik. ICH, intracerebrális hemorrhagia. *p<0,05; (Mann Whitney U teszt)

Az α 2-plazmin inhibitor p.Arg6Trp polimorfizmusa és a trombolitikus terápia kimenetele közötti összefüggések vizsgálata

Az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus allélfrekvenciája a Hardy–Weinberg-egyensúlynak megfelelően alakult a kohorszban (C = 0,8046; T = 0,1953), és gyakorlatilag megegyezett az 1000 Genom projektben található, európai alcsoportra vonatkozó allélgyakoriságokkal (C = 0,01; T = 0,1988) (95). Az α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmus egyetlen mért időpontban sem volt

hatással az α 2-PI aktivitásra vagy antigénszintekre, és nem mutatott összefüggést a stroke súlyosságával, etiológiájával vagy kimenetelével (az adatok nincsenek bemutatva).

MEGBESZÉLÉS

A sikertelen trombolízis háttérében álló okok megértése elengedhetetlen az akut stroke ellátás javítása érdekében. Annak ellenére, hogy az aktivált FXIII és az α 2-PI egyaránt kulcsszerepet játszanak a plazmin-mediálta fibrinolízis elleni védelemben, az általunk leírt két obszervációs tanulmány az első két olyan átfogó vizsgálat, amely ezen két fehérje aktivitását és antigénszintjeit vizsgálja AIS betegekben trombolízis során, valamint ezen fibrinolízis inhibitorok legfőbb polimorfizmusainak összefüggését tanulmányozza a betegek klinikai kimenetelével. Első vizsgálatunk során bemutattuk, hogy a FXIII aktivitása és antigénszintje fokozatosan csökken a trombolízis során. A FXIII szintek ilyen mértékű csökkenésének mechanizmusa egyelőre nem tisztázott. A közelmúltban kimutatták, hogy a plazmin *in vitro* hasítja és inaktíválja az FXIIIa-t, de a FXIII zimogén formáját nem (96). A vizsgálatunkban elvégzett FXIII aktivitás és antigén mérések a keringő zimogén FXIII szinteket tükrözik, és ezen inaktív fehérjét a plazmin feltehetőleg nem képes hasítani. Ezt igazolja az is, hogy vizsgálatunkban a trombolízis előtti és közvetlenül utáni FXIII aktivitás és antigénszintek nem különböztek szignifikánsan. Jelentős csökkenés a FXIII szintekben 24 órával a lízis után következett be, ami arra utal, hogy a plazma FXIII szintjének trombolízis során megfigyelt csökkenése nagy valószínűséggel nem társul jelentős plazmin-mediált FXIII degradációval. Ezen túlmenően, mivel a FXIII aktivitás és a FXIII-A₂B₂ antigén szintje jó korrelációt mutatott a trombolízis előtt és alatt, a FXIIIa plazmin vagy más proteázok általi lebontása feltehetőleg elhanyagolható. A stroke utáni FXIII szintek jelentős csökkenésének legvalószínűbb magyarázata, hogy az aktivált fehérje folyamatosan beépül a növekvő trombusba, ami a vérárvadási rendszer folyamatos aktivitása miatt kialakuló konzumpcióhoz vezet. Ezt a hipotézist egy korábbi tanulmányban is vizsgálták, ahol a FXIII-A alegység szintjét (de nem a FXIII aktivitást) mérték AIS betegek egy kisebb csoportjában (97). Ebben a kohorszban 41 beteg kapott rt-PA vagy urokináz trombolízist, és eredményeik nem különböztek a trombolitikus kezelésben nem részesülő (n=23) AIS betegek eredményeitől.

Az összes, potenciálisan releváns kockázati tényezőt magában foglaló logisztikus regressziós modell segítségével megállapítottuk, hogy a betegek felvétele után 24 órával mért alacsony FXIII szint szignifikáns független előrejelzője a rövid távú mortalitásnak (14 nappal a stroke-ot követően). Ez az eredmény arra utal, hogy a FXIII szint csökkenése közvetlen összefüggést mutat a fatális stroke patomechanizmusával a trombolizált betegekben. Ez a hatás függetlennek tűnik a stroke NIHSS alapján kategorizált súlyosságától. Figyelemre méltó, hogy azoknál a

betegeknél, akik a stroke utáni első héten meghaltak, szokatlanul alacsony volt a FXIII szint a trombolízist követő napon; elmondható, hogy ezeknél a betegeknél a FXIII szint csak mintegy 50%-a volt a jobb kimenetelű betegek FXIII szintjéhez képest. A lízis után 24 órával mért alacsony FXIII szintek nemcsak a rövid távú, hanem a hosszú távú (90. napi) mortalitással is összefüggést mutattak. A logisztikus regressziós modellben azonban a 24 órával a lízis utáni alacsony FXIII szint nem bizonyult a hosszú távú mortalitás független előrejelzőjének. Fontos megjegyezni, hogy a stroke utáni mortalitást hosszú távon számos tényező befolyásolja, beleértve az életkort, a társbetegségeket, jelentős funkcionális neurológiai deficit kialakulása esetén a szociális háttérrel, ápolási körülményeket, stb., mely tényezők esetünkben is magyarázhatják a hosszú távú mortalitással kapcsolatos szignifikáns összefüggések eltűnését. Bár kiindulási hipotézisünkben feltételeztük, hogy az alacsony FXIII szint szerepet játszhat a lízist követően kialakuló intrakraniális vérzés patomechanizmusában, tanulmányunk eredménye ezt nem igazolta. Vizsgálatunk alapján feltételezhetjük, hogy a trombolízist követő vérzéses szövődmények kialakulása nem az alacsony FXIII szinthez köthető. Ez a megállapítás összhangban van a néhány korábban publikált, kislétszámú kohorsz bevonásával készült tanulmány eredményével (98, 99). Betegcsoportunkban az FXIII szint nem volt összefüggésben a stroke súlyosságával. Azt is kimutattuk, hogy a FXIII aktivitás szignifikánsan magasabb volt aterotrombotikus stroke esetén, mint kardioembóliás eredetű stroke esetén (100), mely korábbi tanulmányokhoz hasonlóan felveti a FXIII aterotrombózisban betöltött szerepét, azonban ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek (67).

Ebben a vizsgálatban nem találtunk összefüggést a FXIII-A vagy FXIII-B gyakori polimorfizmusai ill. a stroke súlyossága, kedvezőtlen rövid ill. hosszú távú kimenetele, a terápiával összefüggő vérzéses szövődmények kialakulása és a mortalitás között. A FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus esetében ugyanakkor megemlítendő egy érdekes tendencia, amely szerint a 34Leu allél hordozók esetén gyenge védő hatás lehetséges a kedvezőtlen rövid távú kimenetelekkel szemben, de az összefüggés az általunk vizsgált esetszámok esetén csak határérték statisztikai szignifikanciát mutatott, így az összefüggés igazolására vagy kizárására nagyobb esetszámú vizsgálat elvégzése szükséges. A tanulmányban vizsgált polimorfizmusok közül csak a FXIII-B intron K nt29756 G allélja társult alacsonyabb FXIII szintekkel, de az ismert befolyásoló tényezőkre való adjusztálás után a hordozók és nem hordozók közötti különbségek már nem voltak statisztikailag szignifikánsak. Egy koszorúér-szklerózisban és/vagy akut myocardialis infarktusban szenvedő betegeket vizsgáló tanulmányban a FXIII-B intron K nt29756 G allél hordozóinak FXIII szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, és az allél jelenléte jelentős védelmet nyújtott a koronária szklerózis és myocardialis infarktus ellen az

emelkedett fibrinogén szinttel rendelkező betegeknél, de csak a FXIII-A Leu34 allél jelenlétében. Vizsgálatunkban úgy tűnt, hogy az FXIII-B intron K nt29756 G allél jelenléte nem befolyásolta a trombolízis kimenetelét. Tanulmányunk során a betegek limitált száma miatt azonban nem lehetett alcsoport-analízist végezni, hogy szinergikus hatást keressünk a FXIII-A Leu34 és a FXIII-B intron K nt29756 G allélja között. Egy nemrégiben közölt tanulmányunkban kimutattuk, hogy a FXIII-A Leu34 allél jelenléte szignifikáns védelmet nyújt AIS betegeknél a nagyobb (clot burden score: 0-9) alvadékok kialakulásával szemben (101). A többváltozós elemzés során azonban a polimorfizmus nem bizonyult a trombolízist követően a rövid ill. hosszú távú funkcionális kimenetek független prediktorának. Mivel a trombolízis kimenetelét számos tényező befolyásolja, különösen a stroke súlyossága és lokalizációja, ezen adatok fényében valószínűsíthető, hogy a FXIII-A p.Val34Leu polimorfizmus modifikáló hatása önmagában gyenge és nem járul hozzá jelentősen a betegek általános funkcionális kimeneteléhez.

Bár az α 2-PI a fibrinolízis kulcsfontosságú szabályozói közé tartozik, keveset tudunk az AIS trombolízis kimenetelében betöltött szerepéről. A nemzetközi irodalomban csak néhány tanulmány jelent meg az α 2-PI szintek és az AIS trombolízis kimeneteleinek lehetséges kapcsolatáról, ellentmondásos eredményekkel (99, 102-105). Egy 63 AIS beteg részvételével végzett vizsgálatban az α 2-PI aktivitás kiindulási szintjei jól korreláltak a rekanalizáció sikerességével (105). A rekanalizáció jeleit mutató betegek α 2-PI aktivitása alacsonyabb volt, és az α 2-PI szintet a rekanalizáció egyetlen prediktív markereként írták le, bár nem mutatott összefüggést a hosszú távú kimenetekkel. Másrészt, más kutatócsoportok által végzett vizsgálatokban, az α 2-PI szint csökkenését észlelték a trombolízist követően, azonban az α 2-PI szintek nem mutattak összefüggést a terápia kimenetelével (103-105). Amint arra egy közelmúltbeli szisztematikus tanulmány rámutatott, a hemosztázis és fibrinolízis markereivel, valamint az AIS trombolízis kimenetelével kapcsolatos ellentmondásos adatok számos módszertani kérdésből fakadhatnak (8). Először is, a legtöbb tanulmány viszonylag kis betegpopulációt vont be a vizsgálatokba, így ezen vizsgálatok statisztikai ereje alacsony. A szakirodalomban limitált azon közlemények száma, amelyekben legalább 100 beteg szerepel. Egy másik kritikus tényező a stroke kezdete és a mintavétel közötti időintervallum, mivel a legtöbb tanulmányban a stroke kezdete után 24 órán belül gyűjtik a vérmintát, ami meglehetősen tág időintervallum. Ezen túlmenően a trombolízisben részesülő betegeknél elengedhetetlen a trombolízis előtti és utáni vérminták eredményeinek megkülönböztetése. Ideális esetben a hemosztázis paramétereit a trombolízis megkezdése előtt kellene vizsgálni AIS betegeknél. Végül a kutatási kérdéstől függően egynél több mintavételi időpontra is

szükség lehet a megalapozott következtetések levonásához. A második prospektív obszervációs vizsgálatunkban 421 trombolízis kezelésben részesülő AIS beteget vontunk be, így ez a kohorsz az egyik legnagyobb publikált betegcsoport a nemzetközi irodalomban. Minden betegől vérmintát vettünk a trombolízis előtt és 24 órával a terápiát követően, míg a betegek egy részében a lízis után azonnali mintavételre is törekedtünk. Az α 2-PI szinteket minden időpontban funkcionális teszttel és antigénszint vizsgálattal is teszteltük, mely utóbbi mind a 4 α 2-PI izoformát kimutatta. Az α 2-PI természetes heterogenitásának köszönhetően mindkét tesztből származó eredmények hozzájárulnak az α 2-PI trombolízis során betöltött patofiziológiás szerepének jobb megismeréséhez. Hasonlóan a korábbi tanulmányok eredményeihez, az α 2-PI aktivitás és az antigén szintek jó korrelációt mutattak a vizsgált betegpopulációban (44). Érdekes módon felvételnél csak közepesen erős korrelációt találtunk az aktivitás és az antigén szintek között, mely jelentősen javult a trombolízist követően (44, 101). Ez abból adódhat, hogy az α 2-PI beépülése a trombusba a FXIIIa által elsősorban a PB- α 2-PI-t érinti, ráadásul a beépülés mértékének is van határa (45-50%). Korábbi vizsgálatok szerint a tanulmányunkban is használt kromogén α 2-PI aktivitás tesztek elsősorban a PB- α 2-PI izoforma kimutatására alkalmasak (106, 107). Ezzel szemben az általunk használt α 2-PI antigén teszt mind a 4 izoformát egységesen kimutatja, tehát jobban reprezentálja az α 2-PI csökkenésének mértékét. Ez a jelenség magyarázhatja azt, hogy az α 2-PI antigén teszt vizsgálatainkban szorosabb összefüggést mutatott a stroke súlyosságával és a kimenetekkel az α 2-PI aktivitáshoz képest. További tanulmányok szükségesek a különböző α 2-PI izoformák alvadékba történő beépülésének jobb megismerése érdekében és annak felfedésére, hogy a különböző mértékű beépülés milyen hatással bír a trombolízis kimenetele szempontjából.

Eredményeink alapján az α 2-PI csökkenése jelentős a súlyosabb stroke-ban szenvedő betegeknél. Vizsgálatunk során lépcsőzetes negatív összefüggést találtunk az α 2-PI antigénszintek és a stroke súlyossága között. Szignifikánsan alacsonyabb felvételi α 2-PI antigén szintet találtunk a kedvezőtlen rövid és hosszú távú kimenetelű betegeknél, továbbá a legalacsonyabb kvartilisű felvételi α 2-PI antigénszintek szignifikáns összefüggést mutattak a betegek hosszú távú mortalitásával is. Többváltozós regressziós analízisünkben azonban, amely a hosszú távú kimeneteket meghatározó összes releváns tényezőt is magába foglalta, az α 2-PI nem igazolódott szignifikáns független prediktorként, és csak az életkor és az NIHSS maradt a modellben, mint a hosszú távú kimenetek legfontosabb előrejelzője. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár az α 2-PI beépülése az intracerebrális trombusokba és így a fehérje konzumpciója feltehetőleg összefügg a stroke súlyosságával és nagy valószínűséggel a trombus méretével is, az α 2-PI nyilvánvalóan nem tekinthető a kimenetel független

biomarkerének. Mindazonáltal ezek az eredmények azt sugallják, hogy az $\alpha 2$ -PI szerepet játszhat a trombolízis sikertelenségének patomechanizmusában, és fontos tényező lehet a terápia hatástalanságában súlyos stroke esetén. A jelenlegi eredményekkel összhangban korábbi munkáink során kimutattuk, hogy az $\alpha 2$ -PI fibrinalvadékba való beépülésének mértéke a trombolízist követően kedvező kimenetelű AIS-betegeknél volt a legalacsonyabb (93). Ezek az eredmények összhangban vannak kutatócsoportunk egy másik közelmúltbeli munkájával, ahol kimutattuk, hogy az életkorral és az NIHSS-sel együtt a trombus mérete a trombolízis kimenetelének legfontosabb mutatója, és számos kulcsfontosságú hemosztázis-paraméter felvételekor vagy 24 órával később mért szintje nem mutatott összefüggést a kezelés kimenetelével egy többváltozós modellben vizsgálva (108).

Bár biológiai értelemben véve elképzelhetőnek tűnt, hogy a lízis utáni alacsony $\alpha 2$ -PI szint felelős lehet a terápiával összefüggő ICH eseményekért, a vizsgált kohorszban nem találtunk ilyen összefüggést. Az $\alpha 2$ -PI szintek közvetlenül a lízis után a referencia tartomány alsó határa alatt voltak ezen kohorsz minden vizsgált betegében, de a vérzéses szövődmények nem voltak közvetlenül összefüggésben az $\alpha 2$ -PI szintekkel egyik vizsgált időpontban sem. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi tanulmányokkal, amelyek eredményei arra utalnak, hogy az $\alpha 2$ -PI célzott kiiktatása új farmakológiai stratégia lehet a trombusok feloldására vérzés veszélye nélkül. Az $\alpha 2$ -PI felvételkor mért szintje valóban szignifikánsan alacsonyabb volt a lízis utáni ICH-ban szenvedő betegeknél, azonban a csoportok közötti különbségek nagyon szerények voltak. Mivel a lízis utáni ICH-ban szenvedő betegek felvételekor súlyosabb stroke-ban szenvednek, feltételezhető, hogy a két csoport $\alpha 2$ -PI szintjei között megfigyelt szignifikáns különbség a stroke súlyosságában mutatkozó különbségekkel függ össze. Mivel az $\alpha 2$ -PI szintek az ICH-val vagy anélküli csoportokban jelentős átfedést mutattak a felvételkor, ráadásul az $\alpha 2$ -PI aktivitási szintek nem különböztek a csoportok között, nem valószínű, hogy az alacsony $\alpha 2$ -PI lenne az egyetlen felelős tényező a lízist követő vérzés kialakulásában. Eredményeink alapján elmondható, hogy az $\alpha 2$ -PI nem volt hatással a hematóma növekedésére, mivel az $\alpha 2$ -PI szintek nem mutattak szignifikáns korrelációt a lízis utáni hematóma becsült térfogatával. Másrészt az irodalomból ismert, hogy a súlyosabb stroke-ok nemcsak a lízis sikertelenségével, hanem a vérzéses szövődmények nagyobb esélyével járnak együtt, bár ennek az összefüggésnek az okai eddig nem tisztáztak.

Az $\alpha 2$ -PI heterogenitását befolyásoló paraméterek közül az $\alpha 2$ -PI p.Arg6Trp-t vizsgáltuk a második betegpopulációban. Tekintettel a viszonylag nagy mintaszámra, az $\alpha 2$ -PI p.Arg6Trp polimorfizmusnak az $\alpha 2$ -PI szintekre, a stroke súlyosságára és a terápia kimenetelére gyakorolt hatását is vizsgáltuk, azonban összefüggést egyik esetben sem találtunk. Csak néhány

tanulmány áll rendelkezésünkre, mely az $\alpha 2$ -PI p.Arg6Trp polimorfizmus és az aterotrombotikus események kockázata vagy kimenetele közötti összefüggést vizsgálta. Az eddig közölt, korlátozott értékű adatok alapján arra lehet következtetni, hogy a polimorfizmus nincs hatással az iszkémiás események kockázatára vagy kimenetelére. Amint azt korábban leírtuk, az $\alpha 2$ -PI p.Arg6Trp polimorfizmus mellett az $\alpha 2$ -PI N-terminális hasításának mértékét befolyásoló fontos tényező a keringő APCE (sFAP) szint. Feltételezhető, hogy az $\alpha 2$ -PI Arg6Trp hatását az APCE-szintek tükrében kell figyelembe venni, azonban ez a mérés nem tartozott vizsgálatunk körébe.

Összefoglalva tanulmányaink eredményeit elmondható, hogy az alacsony FXIII szint 24 órával a trombolízis után szignifikáns független előrejelzője az AIS mortalitásnak az eseményt követő 14. napon. Az FXIII szintek vizsgálata 24 órával a lízis után segíthet azonosítani azokat a betegeket, akiknél magas a halálozási kockázat, melynek okán megfontolandó a terápiás lehetőségek újragondolása. A jövőben további vizsgálatokra van szükség nagyszámú betegek bevonásával annak kiderítésére, hogy az ilyen betegek korai kiválasztása segíthet-e javítani az eredményeket intenzifikált kezelési stratégiák biztosításával.

Konklúzióként levonható még, hogy az AIS-betegek $\alpha 2$ -PI szintje drámaian megváltozott a trombolízis során, de a lízis utáni $\alpha 2$ -PI szintek nem mutattak összefüggést a kezelés kimenetelével vagy biztonságosságával. Szignifikánsan alacsonyabb $\alpha 2$ -PI szintet találtunk a felvételtkor súlyosabb stroke-ban szenvedő AIS betegeknél, valamint szignifikánsan alacsonyabb felvételi $\alpha 2$ -PI antigénszinteket voltak megfigyelhetőek a kedvezőtlen rövid és hosszú távú kimenetelű betegeknél, azonban egy többváltozós regressziós analízisben, amely minden, a hosszú távú kimenetelüket meghatározó releváns tényezőt tartalmazott, az $\alpha 2$ -PI szignifikáns hatása csökkent, és csak az életkor és a NIHSS maradt a modellben, mint a hosszú távú kimenetel legfontosabb előrejelzője. Összességében ezek az adatok azt sugallják, hogy bár az $\alpha 2$ -PI a fiziológias fibrinolízis domináns inhibitora, a felvételtkori szintje erősen összefügg a stroke súlyosságával, és nem független előrejelzője a trombolitikus terápia kimenetelének. Feltételezhető azonban, hogy súlyosabb stroke esetén az $\alpha 2$ -PI trombusokba való beépülésének mértéke nagyobb, ami fontos mechanizmusa lehet az rt-PA indukálta trombolízis korlátozott sikerességének ezekben az esetekben.

Limitációk

Mint minden obszervációs klinikai tanulmánynak, jelen vizsgálatainknak is vannak limitációi, és az eredményeket ezen tényezők ismeretében kell értelmezni. Először is, a vizsgálataink célja az volt, hogy a trombolízis során a FXIII ill. $\alpha 2$ -PI szint változásait megfigyeljük, és összehasonlítsuk a terápia kimenetelével, tehát nem eset-kontroll vizsgálatot terveztünk. Ennek megfelelően nem vizsgáltunk kontrollként olyan betegeket, akik nem részesültek trombolízisben. Elméletileg lehetséges lenne a trombolízisben részesülő és nem részesülő AIS betegek FXIII ill. $\alpha 2$ -PI szintjeinek összehasonlítása, azonban az rt-PA-kezelt betegek csoportja erősen szelektált betegcsoport, szigorú beválasztási kritériumokkal (pl. szűk időablak, hatékony véralkadásgátló kezelés hiánya stb.), míg a trombolízisben nem részesülő betegek definíció szerint nem felelnek meg ezen beválogatási kritériumoknak. A két csoport jelentős kiindulási különbségei és a trombolízisben nem részesülő csoport heterogenitása alapján úgy gondoljuk, hogy ezen csoportok összehasonlításából nem feltétlenül lehetne megfelelő következtetéseket levonni.

Másodszor, a betegek bevonása egy központban történt (single-center study), emiatt mintaszámunk korlátozott, de a témában korábban publikált közleményekhez képest az általunk bevont betegek száma a legnagyobb esetszámok közé sorolható (8, 102). Az egyközpontú vizsgálati tervnek köszönhetően vizsgálataink előnye az egységes beteg- és mintakezelés volt; ezen túlmenően a követés miatt elveszített betegek aránya viszonylag alacsony volt, összehasonlítva más, hasonló vizsgálati felépítésű tanulmányokkal (8).

Bár az $\alpha 2$ -PI egyes izoformáinak meghatározásával összetettebb képet kaphattunk volna az $\alpha 2$ -PI patofiziológiájáról, ez meghaladta a vizsgálatunk célkitűzését.

Vizsgálataink a szisztémás hemosztázis rendszerről adtak információt az akut stroke kezelése során, így indirekt módon tükrözték csak a lokálisan zajló folyamatokat.

Végül, mivel mechanikus trombektómiával kezelt betegeket nem vontunk be a vizsgálatainkba, ezért az eredményekből nem lehet következtetéseket levonni nagyérelzáródásban szenvedő AIS-betegek jelenlegi kezelési gyakorlatára vonatkozóan.

ÖSSZEFOGLALÁS

A trombus oldására szolgáló intravénás rt-PA kezelés az AIS szenvedő betegek egy részében nem jár sikerrel, míg az esetek jelentős hányadában mellékhatásként ICH alakul ki. Két prospektív obszervációs klinikai tanulmányban célunk a FXIII és az α 2-PI szintek vizsgálata volt a trombolízis során, hogy meg tudjuk, összefüggésben állnak-e a terápia kimenetelével. A tünetek megjelenéséhez képest 4,5 órán belül rt-PA kezelésben részesült AIS-betegek (n=132 és n=421) vérmintáit a trombolízis előtt és 24 órával később, valamint a betegek egy részében közvetlenül a lízis után vettük. A FXIII aktivitást és antigént ammónia-felszabadulási teszttel és ELISA-val, az α 2-PI aktivitást és antigént kromogén teszttel és az α 2-PI minden izoformáját kimutató ELISA-val mértük. A mintákból meghatároztuk a FXIII-A p.Val34Leu, p.Tyr204Phe, FXIII-B p.His95Arg, intronK (IVS11+144) és α 2-PI p.Arg6Trp polimorfizmusokat. A stroke súlyosságát a felvételtkor és a 7. napon az NIHSS alapján határoztuk meg. A lízis utáni ICH-t az ECASSII szerint osztályoztuk. A hosszú távú kimenetelt az esemény után 3 hónappal az mRS szerint osztályoztuk. Eredmények: A FXIII szintek fokozatos csökkenést mutattak közvetlenül a trombolízis után és 24 órával később, de ez nem volt összefüggésben a lízis utáni ICH-val. Többszörös logisztikus regressziós modellben a legalacsonyabb kvartilisben lévő FXIII szint 24 órával a lízis után a 14. napi mortalitás független előrejelzőjének bizonyult (OR:4,95, 95%CI:1,31-18,68, p<0,05). Az α 2-PI szintek szignifikánsan csökkentek közvetlenül a lízis után, majd újra emelkedtek az eseményt követő napon. A felvételi α 2-PI szintek szignifikáns negatív összefüggést mutattak a stroke súlyosságával. Kaplan–Meier túlélési analízisben a felvételtkor a legmagasabb kvartilisbe tartozó α 2-PI antigénnel rendelkező betegek szignifikánsan jobb hosszú távú túlélést mutattak azokhoz képest, akiknél a legalacsonyabb kvartilisben volt az α 2-PI antigén (HR:4,54; 95%CI:1,92-10,8, p<0,001); azonban többváltozós analízisben az alacsony felvételtkori α 2-PI antigén nem bizonyult a rossz hosszú távú kimenetel független kockázati tényezőjének. Az ICH-t szenvedett betegeknél az α 2-PI antigén csekély mértékben, de szignifikánsan alacsonyabb volt a szövődménymentes betegekhez képest. A FXIII és α 2-PI polimorfizmusok és a terápia kimenetele között nem volt összefüggés. Konklúzió: Eredményeink alapján a trombolízis után 24 órával mért FXIII szint segíthet azonosítani azokat a betegeket, akiknél magasabb a rövid távú mortalitás kockázata. Az alacsony α 2-PI antigénszint a felvételtkor súlyosabb stroke-kal és rossz hosszú távú kimenetellel társult a vizsgált kohorszban. Eredményeink arra utalnak, hogy súlyosabb stroke esetén az α 2-PI szerepet játszhat az rt-PA trombolízis korlátozott hatékonyságában.

SUMMARY

Intravenous administration of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) fails to succeed in a subset of acute ischemic stroke (AIS) patients, while in approximately 6–8% of cases intracerebral hemorrhage (ICH) occurs as side effect. Here we aimed to investigate factor XIII (FXIII) and α 2-plasmin inhibitor (α 2-PI) levels during thrombolysis to find out whether they are associated with therapy outcomes. In two prospective, observational studies, blood samples of AIS patients (n=132 and n=421 patients), all undergoing i.v. thrombolysis by rt-PA within 4.5h of their symptom onset, were taken before and 24 h after thrombolysis, and in a subset of patients, immediately post-lysis. FXIII activity and antigen levels were assessed by an ammonia-release assay and ELISA. α 2-PI activity and antigen levels were measured by chromogenic assay and an in-house ELISA detecting all forms of α 2-PI. FXIII-A p.Val34Leu, p.Tyr204Phe, FXIII-B p.His95Arg, intron K(IVS11 + 144) and α 2-PI Arg6Trp polymorphism were genotyped. Stroke severity was determined by NIHSS on admission and day 7. Post-lysis ICH was classified according to ECASSII. Long-term outcomes were defined at 3 months post-event by the modified Rankin Scale (mRS). Results: FXIII levels showed a gradual decrease immediately after thrombolysis and 24 h later, which was not related to therapy-associated bleeding. In a multiple logistic regression model, a FXIII level in the lowest quartile 24 h post-lysis proved to be an independent predictor of mortality by 14 days post-event (OR:4.95, 95% CI:1.31–18.68, $p < 0.05$). Median α 2-PI activity and antigen levels showed a significant drop immediately post-lysis and increased to subnormal levels at 24 h post-event. Admission α 2-PI levels showed a significant negative stepwise association with stroke severity. In a Kaplan–Meier survival analysis, patients with an α 2-PI antigen in the highest quartile on admission showed significantly better long-term survival as compared to those with α 2-PI antigen in the lowest quartile (HR: 4.54; 95%CI:1.92– 10.8, $p < 0.001$); however, in a multivariate analysis, a low admission α 2-PI antigen did not prove to be an independent risk factor of poor long-term outcomes. In patients with therapy-related ICH, admission α 2-PI antigen levels were significantly, but only marginally lower as compared to those without hemorrhage. No association was found between the investigated FXIII and α 2-PI polymorphisms and therapeutic outcomes. Conclusions: our findings indicate that FXIII levels 24h after thrombolysis might help to identify patients at increased risk for short-term mortality. Low α 2-PI antigen levels on admission were associated with more severe strokes and poor long-term outcomes in the investigated cohort. Our results suggest that in case of more severe strokes, α 2-PI may be involved in the limited efficacy of rt-PA thrombolysis.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Tsao CW, Aday AW, Almarzooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2022;145(8):e153-e639.
2. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018;49(3):e46-e110.
3. Turc G, Bhogal P, Fischer U, Khatri P, Lobotesis K, Mazighi M, et al. European Stroke Organisation (ESO) - European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT) Guidelines on Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *J Neurointerv Surg*. 2019.
4. Berge E, Whiteley W, Audebert H, De Marchis GM, Fonseca AC, Padiglioni C, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Eur Stroke J*. 2021;6(1):I-LXII.
5. Multicenter Acute Stroke Trial--Europe Study G, Hommel M, Cornu C, Boutitie F, Boissel JP. Thrombolytic therapy with streptokinase in acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1996;335(3):145-50.
6. Zivin JA, Fisher M, DeGirolami U, Hemenway CC, Stashak JA. Tissue plasminogen activator reduces neurological damage after cerebral embolism. *Science*. 1985;230(4731):1289-92.
7. Kovacs KB, Bencs V, Hudak L, Olah L, Csiba L. Hemorrhagic Transformation of Ischemic Strokes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(18).
8. Donkel SJ, Benaddi B, Dippel DWJ, Ten Cate H, de Maat MPM. Prognostic Hemostasis Biomarkers in Acute Ischemic Stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(3):360-72.
9. Henderson SJ, Weitz JI, Kim PY. Fibrinolysis: strategies to enhance the treatment of acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2018;16(10):1932-40.
10. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *New Engl J Med*. 2018;378(1):11-21.
11. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. 2015;29(1):17-24.
12. Cederholm-Williams SA. Concentration of plasminogen and antiplasmin in plasma and serum. *J Clin Pathol*. 1981;34(9):979-81.
13. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost*. 2005;93(4):647-54.
14. Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep*. 2012;1(3):185-90.
15. Hudson NE. Biophysical Mechanisms Mediating Fibrin Fiber Lysis. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2748340.
16. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*. 2005;129(3):307-21.
17. Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2015;13 Suppl 1:S98-105.
18. Yaron JR, Zhang LQ, Guo QY, Haydel SE, Lucas AR. Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8.
19. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:655-709.

20. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood*. 1987;69(2):381-7.
21. Simpson AJ, Booth NA, Moore NR, Bennett B. Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues. *J Clin Pathol*. 1991;44(2):139-43.
22. Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest*. 1984;74(4):1465-72.
23. Kluft C, Jie AF, Rijken DC, Verheijen JH. Daytime fluctuations in blood of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and its fast-acting inhibitor (PAI-1). *Thromb Haemost*. 1988;59(2):329-32.
24. Rabieian R, Boshtam M, Zareei M, Kouhpayeh S, Masoudifar A, Mirzaei H. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):17-27.
25. Loskutoff DJ, Samad F. The adipocyte and hemostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(1):1-6.
26. Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood*. 1995;86(11):4007-24.
27. Schneider M, Nesheim M. A study of the protection of plasmin from antiplasmin inhibition within an intact fibrin clot during the course of clot lysis. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13333-9.
28. Sillen M, Declerck PJ. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
29. Foley JH, Cook PF, Nesheim ME. Kinetics of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa)-catalyzed cleavage of C-terminal lysine residues of fibrin degradation products and removal of plasminogen-binding sites. *J Biol Chem*. 2011;286(22):19280-6.
30. Mullertz S, Clemmensen I. The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochem J*. 1976;159(3):545-53.
31. Moroi M, Aoki N. Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J Biol Chem*. 1976;251(19):5956-65.
32. Collen D. Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur J Biochem*. 1976;69(1):209-16.
33. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
34. Barker R, Kehoe PG, Love S. Activators and inhibitors of the plasminogen system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 2012;16(4):865-76.
35. Bangert K, Johnsen AH, Christensen U, Thorsen S. Different N-terminal forms of alpha 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem J*. 1993;291 (Pt 2):623-5.
36. Law RH, Sofian T, Kan WT, Horvath AJ, Hitchen CR, Langendorf CG, et al. X-ray crystal structure of the fibrinolysis inhibitor alpha2-antiplasmin. *Blood*. 2008;111(4):2049-52.
37. Abdul S, Leebeek FW, Rijken DC, Uitte de Willige S. Natural heterogeneity of alpha2-antiplasmin: functional and clinical consequences. *Blood*. 2016;127(5):538-45.
38. Lee KN, Jackson KW, Christiansen VJ, Chung KH, McKee PA. A novel plasma proteinase potentiates alpha2-antiplasmin inhibition of fibrin digestion. *Blood*. 2004;103(10):3783-8.
39. Wiman B, Lijnen HR, Collen D. On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in alpha2-antiplasmin and in fibrinogen. *Biochim Biophys Acta*. 1979;579(1):142-54.
40. Wiman B. Affinity-chromatographic purification of human alpha 2-antiplasmin. *Biochem J*. 1980;191(1):229-32.

41. Klufft C, Los P, Jie AF. The molecular form of alpha 2-antiplasmin with affinity for plasminogen is selectively bound to fibrin by factor XIII. *Thromb Res.* 1984;33(4):419-25.
42. Lind B, Thorsen S. A novel missense mutation in the human plasmin inhibitor (alpha2-antiplasmin) gene associated with a bleeding tendency. *Br J Haematol.* 1999;107(2):317-22.
43. Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, McKee PA. The effect of a single nucleotide polymorphism on human alpha 2-antiplasmin activity. *Blood.* 2007;109(12):5286-92.
44. Barath B, Bogati R, Miklos T, Kallai J, Mezei ZA, Bereczky Z, et al. Effect of alpha2-plasmin inhibitor heterogeneity on the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2021;203:110-6.
45. Bridge KI, Macrae F, Bailey MA, Johnson A, Philippou H, Scott DJ, et al. The alpha-2-antiplasmin Arg407Lys polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm. *Thromb Res.* 2014;134(3):723-8.
46. Fickenscher K, Aab A, Stuber W. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost.* 1991;65(5):535-40.
47. Greenberg CS, Shuman MA. The zymogen forms of blood coagulation factor XIII bind specifically to fibrinogen. *J Biol Chem.* 1982;257(11):6096-101.
48. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komaromi I, Katona E. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol Rev.* 2011;91(3):931-72.
49. Katona EE, Ajzner E, Toth K, Karpati L, Muszbek L. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of blood coagulation factor XIII A-subunit in plasma and in cell lysates. *J Immunol Methods.* 2001;258(1-2):127-35.
50. Byrnes JR, Wilson C, Boutelle AM, Brandner CB, Flick MJ, Philippou H, et al. The interaction between fibrinogen and zymogen FXIII-A2B2 is mediated by fibrinogen residues gamma390-396 and the FXIII-B subunits. *Blood.* 2016;128(15):1969-78.
51. Komaromi I, Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J Thromb Haemost.* 2011;9(1):9-20.
52. Schroeder V, Vuissoz JM, Caflisch A, Kohler HP. Factor XIII activation peptide is released into plasma upon cleavage by thrombin and shows a different structure compared to its bound form. *Thromb Haemost.* 2007;97(6):890-8.
53. Hornyak TJ, Shafer JA. Role of calcium ion in the generation of factor XIII activity. *Biochemistry.* 1991;30(25):6175-82.
54. Hornyak TJ, Shafer JA. Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry.* 1992;31(2):423-9.
55. Muszbek L, Polgar J, Boda Z. Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thromb Haemost.* 1993;69(3):282-5.
56. Bagoly Z, Koncz Z, Harsfalvi J, Muszbek L. Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res.* 2012;129(3):382-7.
57. Bagoly Z, Muszbek L. Factor XIII: What does it look like? *J Thromb Haemost.* 2019;17(5):714-6.
58. Fraser SR, Booth NA, Mutch NJ. The antifibrinolytic function of factor XIII is exclusively expressed through alpha(2)-antiplasmin cross-linking. *Blood.* 2011;117(23):6371-4.
59. Sakata Y, Mimuro J, Aoki N. Differential binding of plasminogen to crosslinked and noncrosslinked fibrins: its significance in hemostatic defect in factor XIII deficiency. *Blood.* 1984;63(6):1393-401.
60. Board PG, Webb GC, McKee J, Ichinose A. Localization of the coagulation factor XIII A subunit gene (F13A) to chromosome bands 6p24----p25. *Cytogenet Cell Genet.* 1988;48(1):25-7.
61. Ichinose A, McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Amino acid sequence of the b subunit of human factor XIII, a protein composed of ten repetitive segments. *Biochemistry.* 1986;25(16):4633-8.

62. Mikkola H, Syrjala M, Rasi V, Vahtera E, Hamalainen E, Peltonen L, et al. Deficiency in the A-subunit of coagulation factor XIII: two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood*. 1994;84(2):517-25.
63. Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, et al. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood*. 2000;96(7):2479-86.
64. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 2000;96(3):988-95.
65. Margaglione M, Bossone A, Brancaccio V, Ciampa A, Di Minno G. Factor XIII Val34Leu polymorphism and risk of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 2000;84(6):1118-9.
66. Voko Z, Bereczky Z, Katona E, Adany R, Muszbek L. Factor XIII Val34Leu variant protects against coronary artery disease. A meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2007;97(3):458-63.
67. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Shemirani AH, Katona E. Factor XIII and atherothrombotic diseases. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(1):18-33.
68. Gallivan L, Markham AF, Anwar R. The Leu564 factor XIII A variant results in significantly lower plasma factor XIII levels than the Pro564 variant. *Thromb Haemost*. 1999;82(4):1368-70.
69. Reiner AP, Schwartz SM, Frank MB, Longstreth WT, Jr., Hindorff LA, Teramura G, et al. Polymorphisms of coagulation factor XIII subunit A and risk of nonfatal hemorrhagic stroke in young white women. *Stroke*. 2001;32(11):2580-6.
70. Pruissen DM, Slooter AJ, Rosendaal FR, van der Graaf Y, Algra A. Coagulation factor XIII gene variation, oral contraceptives, and risk of ischemic stroke. *Blood*. 2008;111(3):1282-6.
71. Komanasin N, Catto AJ, Futers TS, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Ariens RA. A novel polymorphism in the factor XIII B-subunit (His95Arg): relationship to subunit dissociation and venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(11):2487-96.
72. Iwata H, Kitano T, Umetsu K, Yuasa I, Yamazaki K, Kemkes-Matthes B, et al. Distinct C-terminus of the B subunit of factor XIII in a population-associated major phenotype: the first case of complete allele-specific alternative splicing products in the coagulation and fibrinolytic systems. *J Thromb Haemost*. 2009;7(7):1084-91.
73. Aho K, Harmsen P, Hatano S, Marquardsen J, Smirnov VE, Strasser T. Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. *Bull World Health Organ*. 1980;58(1):113-30.
74. Katan M, Luft A. Global Burden of Stroke. *Semin Neurol*. 2018;38(2):208-11.
75. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(5):493-501.
76. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35-41.
77. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*. 1989;20(7):864-70.
78. Aviv RI, Mandelcorn J, Chakraborty S, Gladstone D, Malham S, Tomlinson G, et al. Alberta Stroke Program Early CT Scoring of CT perfusion in early stroke visualization and assessment. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007;28(10):1975-80.
79. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333(24):1581-7.

80. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1317-29.
81. Adams HP, Jr., del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke.* 2007;38(5):1655-711.
82. Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet.* 2004;363(9411):768-74.
83. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grond M, Hacke W, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet.* 2007;369(9558):275-82.
84. European Stroke Organisation Executive Committee, ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25(5):457-507.
85. Simonsen CZ, Schmitz ML, Madsen MH, Mikkelsen IK, Chandra RV, Leslie-Mazwi T, et al. Early neurological deterioration after thrombolysis: Clinical and imaging predictors. *Int J Stroke.* 2016;11(7):776-82.
86. van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke.* 1988;19(5):604-7.
87. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA.* 1995;274(13):1017-25.
88. Karpati L, Penke B, Katona E, Balogh I, Vamosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem.* 2000;46(12):1946-55.
89. Katona E, Haramura G, Karpati L, Fachet J, Muszbek L. A simple, quick one-step ELISA assay for the determination of complex plasma factor XIII (A2B2). *Thromb Haemost.* 2000;83(2):268-73.
90. Shemirani AH, Muszbek L. Rapid detection of the factor XIII Val34Leu (163 G-->T) polymorphism by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer detection and melting curve analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(8):877-9.
91. Mezei ZA, Katona E, Kallai J, Bereczky Z, Molnar E, Kovacs B, et al. Regulation of plasma factor XIII levels in healthy individuals; a major impact by subunit B intron K c.1952+144 C>G polymorphism. *Thromb Res.* 2016;148:101-6.
92. Teraz-Orosz A, Csapo A, Bagoly Z, Szekely EG, Toth E, Kovacs B, et al. A new ELISA method for the measurement of total alpha2-plasmin inhibitor level in human body fluids. *J Immunol Methods.* 2019;471:27-33.
93. Bagoly Z, Barath B, Orban-Kalmandi R, Szegedi I, Bogati R, Sarkady F, et al. Incorporation of alpha2-Plasmin Inhibitor into Fibrin Clots and Its Association with the Clinical Outcome of Acute Ischemic Stroke Patients. *Biomolecules.* 2021;11(3).
94. Bereczky Z, Balogh E, Katona E, Pocsai Z, Czuriga I, Szeles G, et al. Modulation of the risk of coronary sclerosis/myocardial infarction by the interaction between factor XIII subunit A Val34Leu polymorphism and fibrinogen concentration in the high risk Hungarian population. *Thromb Res.* 2007;120(4):567-73.
95. Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.

96. Hur WS, Mazinani N, Lu XJ, Britton HM, Byrnes JR, Wolberg AS, et al. Coagulation factor XIIIa is inactivated by plasmin. *Blood*. 2015;126(20):2329-37.
97. Schroeder V, Ortner E, Mono ML, Galimanis A, Meier N, Findling O, et al. Coagulation factor XIII activation peptide and subunit levels in patients with acute ischaemic stroke: a pilot study. *Thromb Res*. 2010;126(2):e122-7.
98. Sun X, Berthiller J, Trouillas P, Derex L, Diallo L, Hanss M. Early fibrinogen degradation coagulopathy: a predictive factor of parenchymal hematomas in cerebral rt-PA thrombolysis. *J Neurol Sci*. 2015;351(1-2):109-14.
99. Cocho D, Borrell M, Marti-Fabregas J, Montaner J, Castellanos M, Bravo Y, et al. Pretreatment hemostatic markers of symptomatic intracerebral hemorrhage in patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2006;37(4):996-9.
100. Kohler HP, Ariens RA, Catto AJ, Carter AM, Miller GJ, Cooper JA, et al. Factor XIII A-subunit concentration predicts outcome in stroke subjects and vascular outcome in healthy, middle-aged men. *Br J Haematol*. 2002;118(3):825-32.
101. Szegedi I, Orban-Kalmandi R, Nagy A, Sarkady F, Vasas N, Sik M, et al. Decreased clot burden is associated with factor XIII Val34Leu polymorphism and better functional outcomes in acute ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *PLoS One*. 2021;16(7):e0254253.
102. Bagoly Z, Szegedi I, Kalmandi R, Toth NK, Csiba L. Markers of Coagulation and Fibrinolysis Predicting the Outcome of Acute Ischemic Stroke Thrombolysis Treatment: A Review of the Literature. *Front Neurol*. 2019;10:513.
103. Sun X, Berthiller J, Derex L, Trouillas P, Diallo L, Hanss M. Post-thrombolysis haemostasis changes after rt-PA treatment in acute cerebral infarct. Correlations with cardioembolic aetiology and outcome. *J Neurol Sci*. 2015;349(1-2):77-83.
104. Marti-Fabregas J, Borrell M, Cocho D, Martinez-Ramirez S, Martinez-Corral M, Fontcuberta J, et al. Change in hemostatic markers after recombinant tissue-type plasminogen activator is not associated with the chance of recanalization. *Stroke*. 2008;39(1):234-6.
105. Marti-Fabregas J, Borrell M, Cocho D, Belvis R, Castellanos M, Montaner J, et al. Hemostatic markers of recanalization in patients with ischemic stroke treated with rt-PA. *Neurology*. 2005;65(3):366-70.
106. Clemmensen I, Thorsen S, Mullertz S, Petersen LC. Properties of three different molecular forms of the alpha 2 plasmin inhibitor. *Eur J Biochem*. 1981;120(1):105-12.
107. Uitte de Willige S, Miedzak M, Carter AM, Lisman T, Rosendaal FR, Grant PJ, et al. Proteolytic and genetic variation of the alpha-2-antiplasmin C-terminus in myocardial infarction. *Blood*. 2011;117(24):6694-701.
108. Jensen M, Schlemm E, Cheng B, Lettow I, Quandt F, Boutitie F, et al. Clinical Characteristics and Outcome of Patients With Hemorrhagic Transformation After Intravenous Thrombolysis in the WAKE-UP Trial. *Front Neurol*. 2020;11:957.

TÁRGYSZAVAK

α 2-plazmin-inhibitor

Akut iszkémiás stroke

Mortalitás

Kimenet

Súlyosság

Trombolízis

XIII-as faktor

KEYWORDS

α 2-plasmin inhibitor

Acute ischemic stroke

Factor XIII

Mortality

Outcomes

Severity

Thrombolysis

FÜGGELÉK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/407/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Székely Edina Gabriella
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Székely, E. G.**, Orbán-Kálmándi, R. A., Szegedi, I., Katona, É., Baráth, B., Czuriga-Kovács, K. R., Lóczy, L., Molnárné Vasas, N., Fekete, I., Fekete, K., Berényi, E., Oláh, L., Csiba, L., Bagoly, Z.: Low [alfa]2-Plasmin Inhibitor Antigen Levels on Admission Are Associated With More Severe Stroke and Unfavorable Outcomes in Acute Ischemic Stroke Patients Treated With Intravenous Thrombolysis.
Front. Cardiovasc. Med. 9, 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2022.901286>
IF: 3.6
2. **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Bereczky, Z., Katona, É., Mezei, Z. A., Nagy, A. C., Tóth, N. K., Berényi, E., Muszbek, L., Csiba, L., Bagoly, Z.: Low factor XIII levels after intravenous thrombolysis predict short-term mortality in ischemic stroke patients.
Sci. Rep. 8 (1), 1-9, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26025-z>
IF: 4.011

További közlemények

3. Sadeghi, F., Sarkady, F., Zsóri, K. S., Szegedi, I., Orbán-Kálmándi, R. A., **Székely, E. G.**, Molnárné Vasas, N., Berényi, E., Csiba, L., Bagoly, Z., Shemirani, A. H.: High Neutrophil-Lymphocyte Ratio and Low Lymphocyte-Monocyte Ratio Combination after Thrombolysis Is a Potential Predictor of Poor Functional Outcome of Acute Ischemic Stroke.
J. Pers. Med. 12 (8), 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jpm12081221>
4. Orosz, A., Csapó, A., Bagoly, Z., **Székely, E. G.**, Tóth, E., Kovács, B., Bereczky, Z., Muszbek, L., Katona, É.: A new ELISA method for the measurement of total α 2-plasmin inhibitor level in human body fluids.
J. Immunol. Methods. 471, 27-33, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2019.05.004>
IF: 1.901





5. Szegedi, I., Nagy, A. C., **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Sarkady, F., Láncki, L., Berényi, E., Csiba, L., Bagoly, Z.: PAI-1 5G/5G genotype is an independent risk of intracranial hemorrhage in post-lysis stroke patients.
Ann. Clin. Trans. Neurol. 6 (11), 2240-2250, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/acn3.50923>
IF: 3.66
6. Tóth, N. K., **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Sarkady, F., Nagy, O., Láncki, L., Berényi, E., Fekete, K., Fekete, I., Csiba, L., Bagoly, Z.: Elevated factor VIII and von Willebrand factor levels predict unfavorable outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis.
Front. Neurol. 8, 1-10, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2017.00721>
IF: 2.635
7. Hudák, R., **Székely, E. G.**, Czuriga-Kovács, K. R., Nagy, A. C., Hofgárt, G., Berényi, E., Csiba, L., Kappelmayer, J., Bagoly, Z.: Low thrombin generation predicts poor prognosis in ischemic stroke patients after thrombolysis.
PLoS One. 12 (7), 1-13, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180477>
IF: 2.766

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,573

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,611**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.09.04.



KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Bagoly Zsuzsának, a PhD tanulmányom során nyújtott segítségért, támogatásáért illetve a PhD értekezésem elkészüléséhez nyújtott hozzájárulásért.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Muszbek Lászlónak, és Dr. Bereczky Zsuzsannának, hogy lehetőséget biztosítottak számomra a Klinikai Laboratóriumi Tanszéken kutatómunkám elvégzésére.

Köszönet illeti Prof. Dr. Csiba Lászlót, hogy elősegítette PhD munkámat a Neurológiai Klinikával történő kollaboráció során a klinikai vizsgálatok megszervezéséért, a betegminták és betegadatok szolgáltatásáért, valamint köszönöm Dr. Czuriga-Kovács Katalin Réka és Dr. Szegedi István neurológusoknak, hogy mindig a segítségemre voltak, ha kérdésem merült fel a klinikai vizsgálatokkal kapcsolatban.

Köszönettel tartozom minden társszerzőnek, akik segítettek abban, hogy a disszertációm alapjául szolgáló közlemények megszülethessenek.

Köszönöm a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék valamennyi analitikusának, Sarkady Ferencnek, Haramura Gizellának, Szabó Zsuzsannának és Molnár Évának a munkám során nyújtott szakmai tanácsadást és a módszerek elsajátításában nyújtott segítséget.

Hálával tartozom férjemnek és családomnak a folyamatos támogatásért, szeretetért, türelemért és a biztos háttérért, amit nyújtottak nekem PhD tanulmányaim során.

A tanulmányok megvalósulását, és a megjelent publikációk létrejöttét az alábbi pályázati támogatások tették lehetővé: NKFIH OTKA K120042, FK128582, MTA-DE Lendület Hemosztázis és Stroke Kutatócsoport, HUN-REN-DE Cerebrovaszkuláris Kutatócsoport, Debreceni Egyetem ÁOK Lendület és OTKA Bridging támogatás, GINOP 2.3.2-15-2016-00048 és GINOP-2.3.2-15-2016-00043.